Stellenbosch 1973

DIE ORGANISASIE VAN PROTEÏENSINTESE IN HARTSELLE: AKTIVERING VAN AMINOSURE

G. A. Coetzee

1973.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552718_0018

HIERDIE WERK IS UITGEVOER IN DIE
MOLEKULêRE EN SELLULêRE KARDIOLOGIE
NAVORSINGSEENHEID VAN DIE SUID-AFRIKAANSE
MEDIESE NAVORSINGSRAAD

DIE ORGANISASIE VAN PROTEÏENSINTESE IN HARTSELLE: AKTIVERING VAN AMINOSURE

G.A. Coetzee

Skripsie ingelewer vir die graad van Magister in die Natuurwetenskappe
in Geneeskundige Wetenskappe (Geneeskundige Biochemie)
aan die Fakulteit van Geneeskunde, Universiteit van Stellenbosch.

Maart 1973

PROMOTOR:

Prof. W. Gevers

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

BEDANKINGS

Ek wil graag my dank uitspreek teenoor:

Prof. W. Gevers, wat as promotor opgetree het, vir sy leiding, advies, kritiek en aanmoediging gedurende hierdie studie. Dit was 'n inspirasie om onder hom te studeer.

Drr. A.J. Bester en P.A. Jones, vir talle besprekings en van wie ek baie fundamentele biochemiese tegnieke geleer het.

My vrou, vir haar geduld en ondersteuning, en ons ouers vir hulle belangstelling.

Mevv. M.E. Marais en W.M. Campher vir die set van die skripsie, en Mnre. N.J. Potgieter en H. Roelofs vir die tegniese versorging.

Die Suid-Afrikaanse Mediese Navorsingsraad, Suid-Afrikaanse Raad op Atoomkrag en Harry Crossley Stigting vir finansiële steun.

My beskeie erkenning vir die hulp van God, waarsonder niks moontlik is nie.

OPSOMMING

Aminosuuraktivering in hartselle is ondersoek met die oog op die moontlike rol wat die aminosuur-aktiveringsensieme in die organisasie van proteïenbiosintese kan speel. Eerstens is metodes vir die kwalitatiewe en kwantitatiewe bepaling van die aktiwiteit van een aktiveringsensiem, dié vir fenielalanien, gestandardiseer. Dit is ook gevind dat die grootste gedeelte van hierdie ensimatiese aktiwiteit in die sitoplasma van die rothartsel aangetref word.

Twee maklik-skeibare vorms van fenielalaniel-tRNA sintetase is waargeneem: Die een vorm, F_A genoem, het 'n molekulêre massa van ongeveer 194 000 dalton, kan hoofsaaklik net die primêre aktivering van fenielalanien kataliseer, en is baie minder aktief t.o.v. die oordragingsreaksie na tRNA as die ander vorm, E_T genoem. E_T het 'n molekulêre massa van ongeveer 150 000 dalton en is die fisiologiese „voltooide" ensiem, aangesien dit die hele *in vivo* reaksie kataliseer. E_T is egter in vergelyking met E_A onaktief t.o.v. die primêre aktiveringstap van die reaksie en dit lyk asof dit nie die intermediêre fenielalaniel-adenilaatkompleks vorm nie. Daar is gevind dat hierdie maklik-skeibare vorms nie in ander getoetste aktiveringsensieme na vore kom nie, maar dat fenielalaniel-tRNA sintetase as E_A en E_T skeibaar is in verskeie ondersoekte rotorgane. 'n Klein verskil in die gedrag van E_A is in hamsterharte waargeneem.

Daar word oor die moontlike rol van E_A en E_T gespekuleer en toekomstige benaderings in die ondersoek word bespreek.

SUMMARY

Amino acid activation in heart cells was investigated to determine the role of amino acid activating enzymes in the organization of protein biosynthesis. Methods were standardised to detect and quantify phenylalanine activating enzyme activity. It was found that the greatest part of this activity was located in the cytoplasm of rat heart cells.

Two separable forms of phenylalanyl-tRNA synthetase were observed. The one form, E_A (molecular weight approximately 194 000 daltons), is able to catalyse the primary activation of phenylalanine. It is, however, much less active in the transfer of the amino acid to acceptor tRNA, than the other form, E_T. The E_T form (molecular weight approximately 150 000 daltons) is the physiological "complete" enzyme, as it is capable of catalysing the acylation of tRNA starting with the free amino acid. In comparison with E_A the E_T form appears to be inactive in the formation of the aminoacyl-adenylate intermediate. Other activating enzymes tested were not separable into two forms under the conditions used. Two forms of phenylalanine activating enzyme were also found in several other rat organs. A small difference in the properties of E_A was found in hamster hearts.

The possible role of E_A and E_T and future approaches to the problem, are discussed.

INHOUDSOPGAWE

Bedankings ii

Opsomming iii

Summary iv

Hoofstuk 1: Inleiding 1

Fisiologiese en biochemiese aspekte van hart-selproteïene 1

Aminosuuraktivering 5

Hoofstuk 2: Ontwikkeling van Metodes 12

Inleiding 12

Metodes 14

Resultate en Bespreking 17

Hoofstuk 3: Fenielalaniel-tRNA Sintetase van Hartselle 22

Inleiding 22

Metodes 22

Resultate en Bespreking 24

Hoofstuk 4: Universaliteit van E_A en E_T vorms van feniel-alanienaktiveringsensiem 30

Inleiding 30

Metodes 30

Resultate en Bespreking 31

Hoofstuk 5: Algemene Besprekings 36

Materiaal 39

Afkortings 40

Verwysings 42

HOOFSTUK 1

INLEIDING

1.1 Fisiologiese en biochemiese aspekte van hartselproteïene

1.1.1 Struktuur en funksie van die hartselproteïene

Soos in ander weefsel, bestaan die selpopulasie van die hartspier uit 'n mengsel van seltipes. Sasaki, *et al* (1968) het bv. bereken dat kontraktiele selle by volwasse rotharte slegs 24% en by dag-oud rotharte 58% van die totale aantal spierselle uitmaak. Die res van die selle is fibroblaste, endoteelselle en perisiete. Die studie van die kontraktiele selle in hart-, sowel as skeletspier, en veral die onoplosbare kontraktielproteïenkomponente van hierdie selle, word al 'n geruime tyd deur navorsers gedoen. In elektronmikroskoopfoto's (Hirakow, 1970) kan die georganiseerde proteïenstruktuur en die ingewikkelde verpakking van strukturele komponente en membraansisteme, binne sowel as buite die sel, duidelik gesien word. 'n Hartspiervesel bestaan uit 'n groot aantal kontraktiele selle wat benewens die algemene selkomponente [Kern, mitochondria, lisosome, membraansisteme, ribosome (membraangebonde of vry) en oplosbare proteïene], die miofibrille bevat wat die funksionele eenheid van die hartspier is. Die kontraktiele selle word onderling verbind deur interkalêre skywe, om die selle in 'n hegte raamwerk in die vesel te bind.

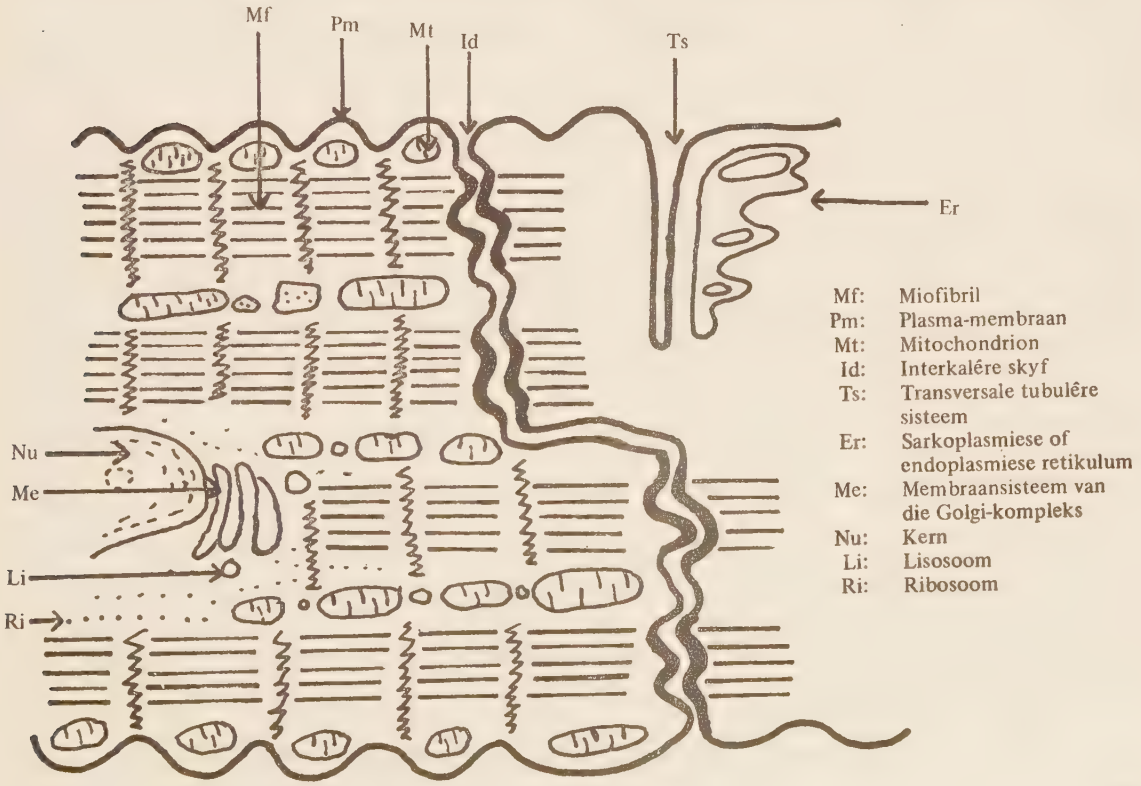


Fig 1.1 Skematiese voorstelling van Miokardiale Sel (Kontraktiele Sel)

Die miofibrille bestaan uit herhalende eenhede van sarkomere.

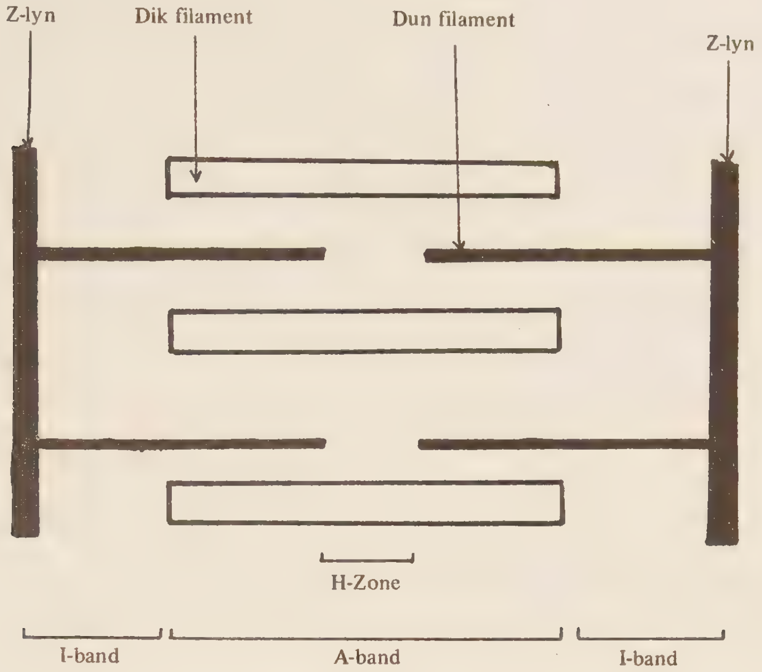


Fig 1.2 Skematiese voorstelling van 'n Sarkomeer

Huidige begrippe van die miofibrillêre kontraktiele proteïene t.o.v. struktuur en funksie is baie goed opgesom in die oorsigartikels van Katz (1970) en Dreizen (1971).

(a) Dik filament

Die dik filament in die A band van die sarkomeer bestaan uit miosien. Die miosienmolekuul, wat groot genoeg is om met die elektronmikroskoop gesien te kan word, het 'n lang staafagtige stertgedeelte (1 300 angstrom in lengte, 20 angstrom in deursnee) en 'n globulêre kopgedeelte (200 angstrom in lengte, 50 angstrom in deursnee) (Huxley, 1963). In die natiewe miosienmolekule bestaan die aksiale stert uit twee swaar polipeptiedkettings (210 000 dalton, molekulêre massa) wat in die kopgedeelte uitloop. Laasgenoemde bevat twee ligte polipeptiedkettings met gemiddelde molekulêre massas van 20 200 dalton. (Dreizen, 1971). Die kopgedeelte bevat miosien se Ca^{++}-afhanklike ATPase aktiwiteit (Gershman, *et al.*, 1969) en die bindingsplek vir die dun filament (Young, 1967), terwyl die stertgedeelte, wat hoofsaaklik 'n dubbele α-heliks (Lowley, 1965) is, slegs 'n strukturele rol uitoefen t.o.v. aggregasie van 'n hele reeks indiwiduele miosien molekules op 'n baie spesifieke manier (sien onder).

(b) Dun filament

Die hoofproteïen van die dun filament is aktienmonomere (G-aktien) wat gepolimeriseer is (F-aktien) (Straub, 1942) in lang filamentagtige strukture. Die aktienvesels is in noue assosiasie (stoichiometries) met tropomiosien *in situ* (Maruyama, 1964). Tropomiosien bestaan uit twee kettings elk met 'n molekulêre massa van 35 000 dalton (Woods, 1969), wat op 400 angstrom intervalle in die dun filament geassosieer is met troponienkomplekse (Higashi, *et al.*, 1968). Hierdie troponienkomplekse bestaan uit troponien A (~15%) en troponien B (~65%) (Hartshorne, *et al.*, 1969). Troponien A (Ca^{++}-bindende proteïen) is globulêr en bestaan uit 'n enkele peptiedketting (molekulêre massa, 18 000 dalton), terwyl troponien B uit twee peptiedkettings (molekulêre massas 24 000 en 37 000 dalton, onderskeidelik) bestaan (Perry, 1972).

Die troponienkompleks van die dun filament en die kop van miosien van die dik filament is die plekke waar die dun en dik filamente in interaksie tree om oor mekaar te skuif. Dit is dan die basis van kontraksie en verslapping van die miofibril (Katz, 1970).

1.1.2 Die biosintese van Hartselproteïene

Uit 1.1.1 tree die kompleksiteit van hartspierproteïene sterk na vore. Veral uit die geordende manier waarin hulle voorkom, kan gesien word dat die organisasie van miofibrille afhanklik moet wees van 'n definitief-geordende sintese- en afbraakpatroon.

Wat proteïenbiosintese in die algemeen aanbetref, is daar in die afgelope dekade geweldig baie informasie i.v.m. die meganisme van die ribosomale proses, veral d.m.v. studies op mikroörganismes en ook later op soogdiersisteme, ingewin (Lucas-Lenard en Lipmann, 1971). Proteïenbiosintese kan gedefinieer word as die aktiewe endergoniese proses waar aminosure in proteïene gepolimeriseer word op ribosome in akkurate volgorde, soos bepaal deur die ko-liniêre mRNA, en m.b.v. tRNA en ander faktore in die sitoplasma. Ekstrapolasie van hierdie konsepte is egter nie bevredigend wanneer gedetailleerde kennis van die proteïenbiosintese van 'n spesifieke orgaan, met spesifieke en unieke proteïene, verlang word nie.

Daar word hoofsaaklik drie tipes ribosome in die soogdiersel aangetref. Die eerste soort is die vry ribosome wat grotendeels vir die sintese van intrasellulêre oplosbare proteïene verantwoordelik is. Verder word membraangebonde ribosome op die growwe endoplasmatiese retikulum aangetref. Daar word tans geglo dat hierdie membraangebonde ribosome veral „uitvoer" proteïene sintetiseer, wat dan deur die gladde endoplasmatiese retikulum na die Golgi-apparaat beweeg. Hier vind verpakking in granules plaas, voordat

die ensieme, hormone of serumproteïene na die selwand vervoer word, waar hulle in die intersellulêre vloeistof vrygestel word (Caro en Palade, 1964). Die derde klas van ribosome word in mitochondria van soogdierselle aangetref (Cohen, 1970). Dus het mitochondria hul eie proteïen-sintetiserende masjinerie.

Indien die geordende struktuur van kontraktiele proteïene weereens beskou word, ontstaan die vraag van waar en hoedanig hul sintese plaasvind. Heywood en Rich (1968) het deur poliribosoom-analise van kuikenembrioskeletspier op sukrose-digtheidsgradiënte, en dan uitvoering van *in vitro* biosintese met verskillende polisoomgroepe, opgevolg deur produkanalise na sintese, aangetoon dat die swaar kettings van miosien op polisome bevattende 55 – 65 ribosome, aktien sowel as ander ongeïdentifiseerde proteïene op polisome met 15 – 25 ribosome, en tropomiosien op polisome met 5 – 8 ribosome, gesintetiseer word. Galavazi (1971) het in 'n elektronmikroskopiese studie van wit skeletspier van rotte, verskeie polisome tussen die miofibrille waargeneem wat in grootte met die gepostuleerde proteïenspesifieke polisome van Heywood en Rich (1968) ooreenstem. Hulle kon in die elektronmikroskoopfoto's helikale polisome met 50 – 65 ribosome, ander helikale polisome (4 tot 5 draaie) met 15 – 25 ribosome, en kleiner rosetagtige polisome met 4 – 6 ribosome (moontlik betrokke by die sintese van ligte subeenhede van miosien) aantoon.

Daar is tans twee hoofteorieë i.v.m. die biosintese van die miofibril. Uit 'n elektronmikroskopiese studie het Larson, *et al.* (1969) lyne ribosome (polisome) langs party miosienfilamente binne die miofibril waargeneem, wat op 'n *in situ* neerlegging van kontraktiele proteïene dui (miofibrillêre verdikking). Dit lyk asof die presiese rangskikking van die polisome dus verband hou met die meganisme waartydens bv. die miosienfilament gesintetiseer word. Daar is geen bewys dat die posisie van so 'n polisoom deur die strukturele konfigurasie van die ontwikkelende miofibril bepaal word nie. Verder is dit waarskynlik dat die ribosome relatief stasionêr tydens die sinteseproses is, sodat die nuutgesintetiseerde proteïensubeenhede op die presiese plek gevorm word, waar hulle later hul funksies sal verrig. 'n Tweede teorie i.v.m. miogenese word beskryf deur Legato (1970) en behels sarkomerogenese d.m.v. Z-lyn verbreding in die miokardium (d.w.s. miofibrillêre verlenging). M.b.v. 'n deeglike elektronmikroskopiese studie kon sy 'n gelydelike verbreding van die Z-lyn tussen sarkomere aantoon, totdat 'n nuwe sarkomeer gevorm is. Reedsgesintetiseerde kontraktiele proteïene word dus in die Z-lyn area neergelê, want geen polisome word hier gesien nie, en dit suggereer 'n baie meer komplekse rol van die Z-lyn as 'n bloot meganiese verbintenis tussen sarkomere, soos dit voorheen aanvaar is.

Uit die voorafgaande besprekings van hartselproteïene en hul sintese is dit duidelik dat in enige sel, en dan veral in die kontraktiele sel van die hart, die ribosomale proteïensintese struktureel en funksioneel 'n goedgedefinieerde geordende patroon moet volg. Vir 'n normaalfunksionerende hart moet daar 'n gedurige, dinamiese omset van hartproteïene wees, wat dus benewens die sintese ook die afbraak van proteïene behels. Daar kan oor verskeie moontlike reguleringspunte in bg. proses gespekuleer word, waarvan die beskikbaarheid van aminosure, hul aktivering en oordraging na spesifieke tRNA's baie belangrik blyk te wees. Die influks van aminosure na 'n proteïenmaaltyd stimuleer proteïensintese en verminder proteïenafbraak sodat meer ribosome in polisome gebruik word. As aminosuurabsorpsie gestaak word, word die proses omgekeer sodat afbraak van proteïene en RNA in die sel versnel word (Munro, 1968). Meer onlangse resultate van Schreiber, *et al.* (1972), toon egter dat hierdie proses nie so eenvoudig is nie, want geperfuseerde harte het vir proteïensintese, blykbaar eerder van aminosure afkomstig van afbraakprosesse in die sel gebruik gemaak, as van dié komende van buite die sel. Dit lyk asof daar 'n onderskeid tussen verskillende aminosuurpoele in die sel gemaak word. Chou en Johnson (1972) kon ook in 'n deeglik gekorreleerde sisteem aantoon dat daar geen matematiese verband tussen die vry aminosuurpoel, en die vlak van amino-asilering van tRNA, tydens die na-geboorte ontwikkeling van rotbrein, bestaan nie. Hulle stel voor dat amino-asiel-tRNA, die direkte voorloper tot proteïenbiosintese, eerder gemeet moet word om die aminosuurbeskikbaarheid vir translasie te evalueer.

Al bg. feite in ag genome, is daar op 'n studie van amino-asiel-tRNA sintetases (sien 1.2) besluit om 'n beter insig in die organisasie van proteïensintese in hartselle te verkry, aangesien proteïenbiosintese absoluut afhanklik is van 'n aanvanklike aktivering van aminosure en hul oordraging na tRNA.

1.2 Aminosuuraktivering

Aanvanklik, in die laat dertigerjare, is gemeen dat die sintese van proteïene vanaf aminosure net as die omgekeerde van die toe-bekende protease reaksies verloop. Die termodinamiese berekenings van Borsook en Dubnoff (1940) het egter aangetoon dat die sintese van 'n peptiedband deur die kondensasie van twee vry aminosure, 'n endergoniese reaksie is. Energie word dus benodig tydens die biosintese van die peptiedband. Lipmann (1941) het egter voorgestel dat aminosure by hul α-koolstofatoom as fosforiel-derivate geaktiveer word. Gedurende die vyftigerjare is hierdie aktivering deur verskeie navorsers aangetoon

en veral Hoagland, *et al.* (1956) het die rol van ATP en die α-koolstofatoom van aminosure in hierdie reaksie aangetoon. Aanvanklik is die groep ensieme wat hierdie reaksies kataliseer die aktiveringsensieme genoem, maar later, toe die rol van tRNA in hierdie verband aangetoon is, staan hulle ook bekend as amino-asiel-tRNA sintetases of aminosuur: tRNA ligases. Aan die einde van die vyftiger- en vroeëre sestigerjare het baie navorsers aangetoon dat 'n spesifieke ensiem elke spesifieke aminosuur aktiveer en na 'n spesifieke tRNA oordra. Sedertdien is verskeie aktiveringsensieme uit 'n verskeidenheid bronne geïsoleer (Peterson, 1967).

1.2.1 Die meganisme van die reaksie

Dit word algemeen (Mehler en Chakraburtty, 1971), alhoewel nie universieel (Loftfield, 1972) aanvaar, dat die Mg^{++}-afhanklike aktivering van 'n individuele aminosuur (in hierdie studie fenielalanien), deur 'n spesifieke aminosuur: tRNA ligase, deur 'n verpligte tweestap meganisme verloop, waarin 'n tRNA-onafhanklike, omkeerbare, primêre reaksie, wat 'n ensiemgebonde amino-asieladenilaat vorm (a) gevolg word deur die oordrag van die geaktiveerde amino-asielderivaat na 'n spesifieke tRNA (b):

$$\text{(a)}\quad AA_1 + ATP + Ensiem_1 \overset{Mg^{++}}{\rightleftharpoons} Ensiem_1\text{----}AA_1AMP + PPi$$

$$\text{(b)}\quad Ensiem_1\text{----}AA_1AMP + tRNA^1 \rightleftharpoons AA_1\text{-}tRNA^1 + AMP + Ensiem$$

Die reaksiemeganisme soos dit algemeen aanvaar word, word skematies in fig. 1.3 op bladsy 7 voorgestel (Mc Elroy, *et al.*, 1967).

Dié voorstelling is slegs 'n veralgemening van die reaksie en elke sintetase reageer nie op dieselfde wyse nie. Hirsh (1968) het bv. die verskillende tempo's van aminosuurhidroksamaatvorming van verskeie amino-asiel-tRNA sintetases aan twee faktore toegeskryf: Verskillende grade van beskerming van die amino-asieladenilate deur die ensiem, en in sommige gevalle (veral treoniel-tRNA sintetase) die verandering van die ensiem vanaf sintetase na 'n hidrolase in die teenwoordigheid van NH_2OH, wat 'n beskermingsmeganisme kan wees teen foutiewe oordraging na ander substrate as die natuurlike.

Loftfield (1972) huldig egter die teorie dat daar geen intermediêre amino-asieladenilaatensiemkompleks gevorm word tydens die reaksie nie, en stel slegs 'n eenstap reaksiemeganisme voor. Benewens ander redenasies berus sy teorie hoofsaaklik op kinetiese oorwegings en waarnemings gedoen deur Igarashi, *et al.* (1971, 1972) en Pastuszyn en

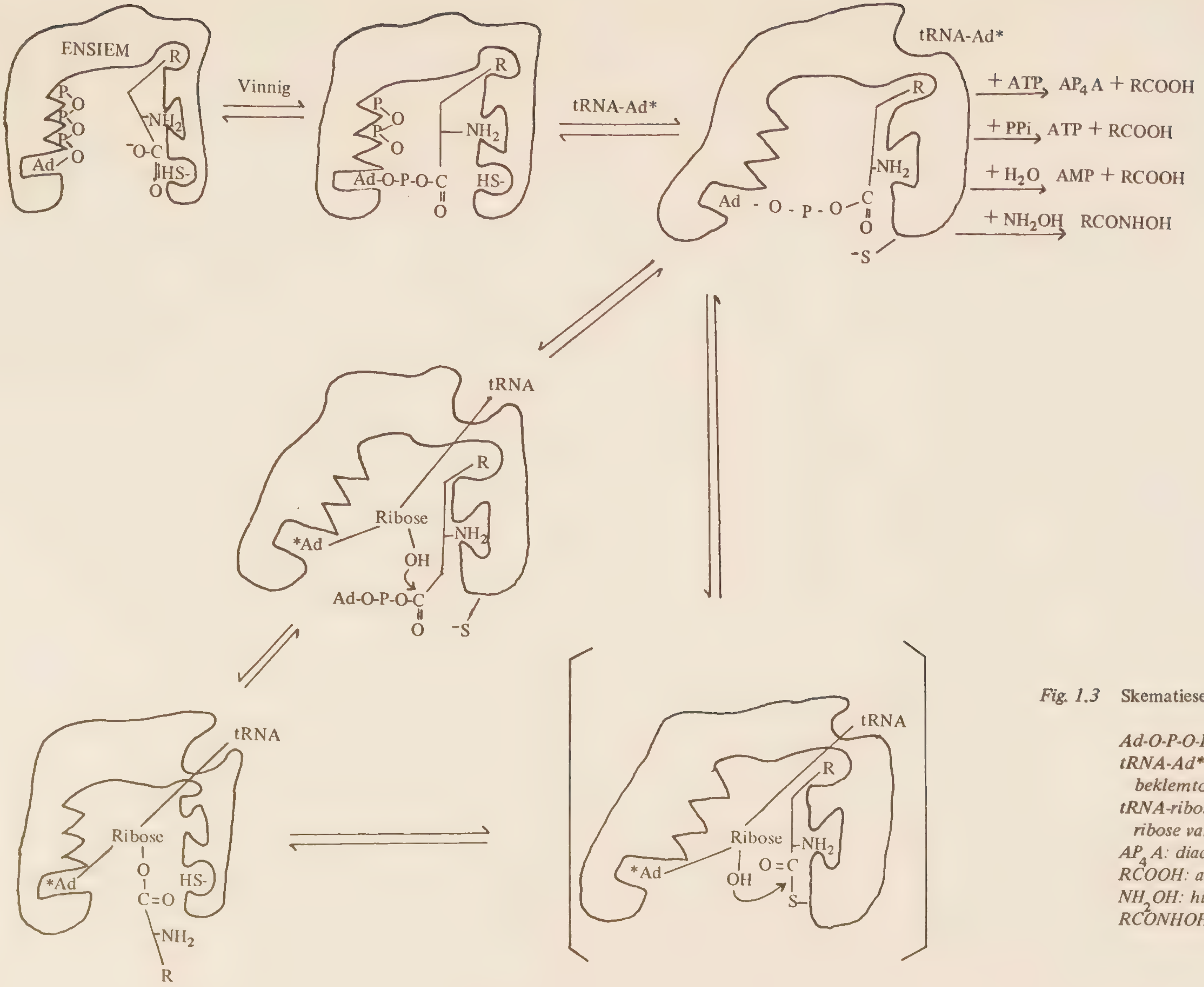
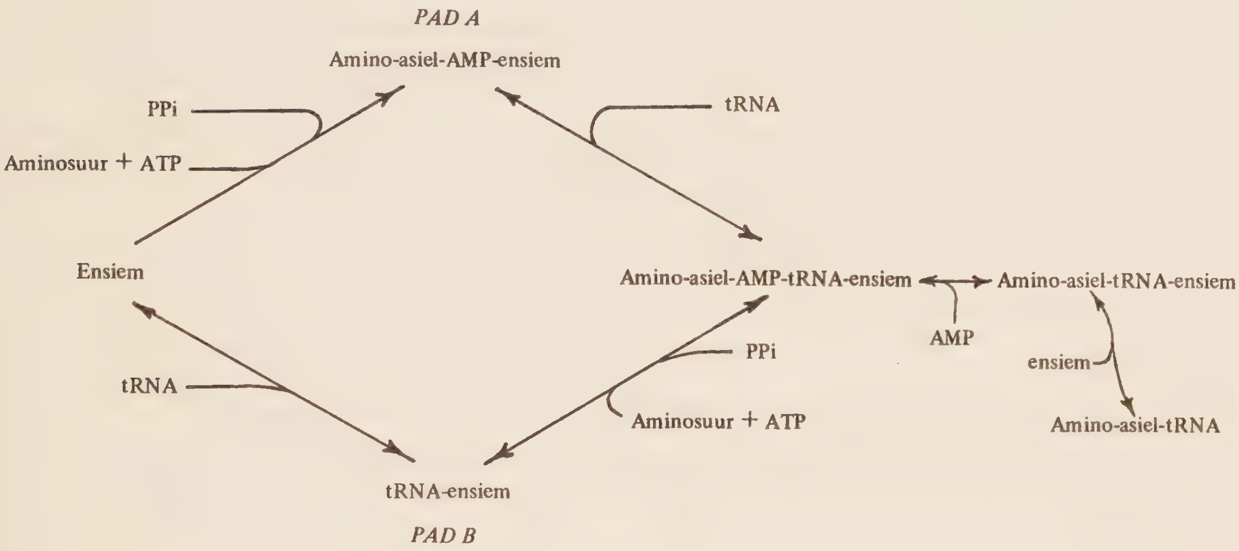


Fig. 1.3 Skematiese voorstelling van die reaksiemeganisme

Ad-O-P-O-P-O-P: ATP
tRNA-Ad: tRNA met 3[1]-terminale adenosien beklemtoon*
tRNA-ribose-Ad: tRNA met 3[1]-terminale ribose van adenosien beklemtoon*
AP_4A: diadenosientetrafosfaat
RCOOH: aminosuur
NH_2OH: hidroksielamien
RCONHOH: aminosuurhidroksamaat

Loftfield (1972) wat aangetoon het dat in *E. coli* die poliamien – (spermien, spermidien, ens.) afhanklike asilering van tRNA sonder die vorming van die intermediêre amino-asiel-adenilaatensiemkompleks (wat met PPi kan reageer) geskied. Kinetiese studies op lisiel-tRNA sintetase van *E. coli* (Marshall en Zamecnik, 1970) het hierdie navorsers ook laat voorstel dat die vorming van lisiel-tRNA nie die lisiel-AMP-ensiem as 'n verpligte intermediêr benodig nie. Hulle stel dus twee moontlike paaie vir vorming van lisiel-tRNA, soos gekataliseer deur lisiel-tRNA sintetase, voor.



1.2.2 Spesifisiteit van die ensieme

Elke aminosuur het ten minste een amino-asiel-tRNA sintetase (dus ten minste 20 ensieme) en elke ensiem is besonder spesifiek t.o.v. sy aminosuur. Daar is egter wel gevalle waar die aanvanklike aktiveringstap in die reaksie nie so spesifiek is nie, maar in so 'n „verkeerde" reaksie is die Km-waarde van die ensiem vir hierdie aminosuur gewoonlik baie hoër as vir die natuurlike substraat. Die oordragingsreaksie na tRNA is egter so spesifiek dat foute feitlik geheel en al by hierdie punt uitgesluit word (Peterson, 1967).

Die geaktiveerde aminosuur word na die 3^1– $CpCpA_{OH}$terminaal van tRNA oorgedra, wat universieel vir alle tRNA's is, en ook die akseptoraktiwiteit van die tRNA bepaal, aangesien tRNA sonder hierdie $CpCpA_{OH}$terminaal alle akseptoraktiwiteit verloor (Hecht, *et al.*, 1959; Preiss, *et al.*, 1959). Die res van die tRNA-molekule moet dus o.a. die uitkenningsplek van die aktiveringsensiem besit. Hieroor is daar egter nog geen duidelikheid nie. Teenvloeidistribusie-isolasies van tRNA het aangetoon dat daar gewoonlik meer as een tRNA vir elke aminosuur bestaan (Bennett, *et al.*, 1965). In alle homoloë sisteme

wat tot dusver bestudeer is, was die aktiveringsensiem in staat om al die tRNA's (iso-tRNA's) vir 'n spesifieke aminosuur te herken, alhoewel daar in heteroloë sisteme voorbeelde beskryf is waar die ensiem van een bron net een van die iso-tRNA's van 'n ander bron kon herken (Von Ehrenstein, 1970). Alhoewel die sintetases dus gewoonlik baie selektief t.o.v. hul tRNA's is, is daar tog gevalle waar sintetases ,,verkeerde'' tRNA's bind [bv. iso-leusiel-tRNA sintetase van *E. coli*, wat fenielalaniel-tRNA kon bind (Yarus, 1972a)]. Alhoewel sodanige bindings altyd swakker as die natuurlike is, kan dit tog *in vivo* bepalend wees. Yarus (1972b) het egter in 'n teoretiese beredenering daarop gewys dat mis-asilering nie *in vivo* plaasvind nie, juis a.g.v. die *in vivo* opset: tRNA en sintetase is in min of meer dieselfde molêre verhoudings in die sel teenwoordig (Yarus en Berg, 1963; Calender en Berg, 1966) en elke sintetase bind sy eie natuurlike tRNA of tRNA's (iso-tRNA's). Daar bly dus baie min vry tRNA's oor vir sg. ,,verkeerde'' bindings, en dit verklaar die korrektheid van die *in vivo* tRNA-asilering. So 'n korrekte asilering is natuurlik absoluut noodsaaklik omdat die tRNA die anti-kodon besit en as amino-asiel-tRNA die genetiese informasie van mRNA moet uitken.

Die sintetases is onaktief in die teenwoordigheid van ander nukleosiedtrifosfate as ATP, terwyl Mg^{++} in 'n meerdere en mindere mate deur ander divalente katione vervang kan word (Peterson, 1967).

1.2.3 Molekulêre konformasie van die aktiveringsensieme

Die molekulêre massas van amino-asiel-tRNA sintetases strek ongeveer oor 'n tweevoudige gebied met seriel-tRNA sintetase (89 000 dalton) sover die kleinste en fenielalaniel-tRNA sintetase (180 000 dalton) die grootste, alhoewel die molekulêre massas van dieselfde ensiem van spesie tot spesie verskil. Die meeste sintetases het egter 'n molekulêre massa van ongeveer 100 000 dalton (Peterson, 1967). Alhoewel vroeëre spekulasie voorgestel het dat alle *E. coli* amino-asiel-tRNA sintetases dieselfde subeenheidstruktuur het (Mc Elroy, *et al.*, 1967), is dit egter nie die geval nie. Proliel-, seriel- en methioniel-tRNA sintetase het bv. ongeveer dieselfde 2 subeenheidstrukture met 'n subeenheid-molekulêre massa van 40 000 tot 50 000 dalton (Lee en Muench, 1969; Lemoine, *et al.*, 1968; Bruton en Hartley, 1968). Aan die ander kant is dit aangetoon dat isoleusiel- (Arndt en Berg, 1970) en valiel- tRNA sintetase (Berthelot en Yaniv, 1970) molekulêre massas van ongeveer 110 000 dalton het, en as enkele polipeptiedkettings voorkom, d.w.s. geen subeenheidstruktuur het nie. Die subeenheidstruktuur en molekulêre massa van fenielalaniel-tRNA sintetase is egter uniek. Hierdie ensiem van *E. coli* het 'n verbasende hoë

molekulêre massa (181 000 dalton), en bestaan uit 4 identiese subeenhede met molekulêre massas van 43 000 dalton elk (Kosakowski en Böck, 1970).

In die jongste tyd geniet die verband tussen molekulêre konformasie en aktiwiteit van die aktiveringsensieme baie aandag. Tydens werk gedoen deur Rouget en Chapeville (1970, 1971(a), 1971(b), 1971(c)) op leusiel-tRNA sintetase van *E. coli,* het baie interessante aspekte van dié ensiem na vore gekom. Hulle was in staat om twee vorms van die ensiem aan te toon, te isoleer en interveranderings teweeg te bring. Een van die twee vorms (E_I) kan ATP-PPi uitwisseling kataliseer maar is onaktief t.o.v. asilering van tRNA, terwyl die ander vorm (E_{II}) albei bg. reaksies kan kataliseer. Albei het 'n molekulêre massa van ongeveer 105 000 dalton. Verder kon hulle ook twee faktore wat die interverandering van die twee vorms veroorsaak, isoleer. Die een (F_1) is 'n proteïen (molekulêre massa 20 000 dalton) wat in die sitoplasma voorkom, wat heelwaarskynlik proteolities van aard is, en wat in staat is om E_{II} na E_I te verander. Die ander faktor (F_2) is 'n oligopeptied met 'n molekulêre massa van 3 000 dalton. As dit by E_I gevoeg word, verander dié ensiem na een met chromatografiese en katalitiese eienskappe soos E_{II}. Al verskil wat hierdie $E_I - F_2$ assosiasie met natiewe E_{II} vertoon, is dat $E_I - F_2$ (soos E_I) in 8 M urea of 6 M guanidiniumchloried in 2 subeenhede dissosieer, terwyl E_{II} nie dissosieer nie. Bg. het Rouget en Chapeville dus in staat gestel om te spekuleer oor die proteolitiese beheer wat F_1 op leusiel-tRNA sintetase kan uitvoer.

'n Ander interessante waarneming is gedoen deur Davies en Marshall (1972), tydens suiweringstappe van asparaginiel-tRNA sintetase van konynlewer. Hulle het gevind dat die ensiem tydens suiwering aktiwiteit verloor a.g.v. 'n gedeeltelike skeiding van twee komponente (molekulêre massas ongeveer 35 000 dalton), wat vir volle ensimatiese aktiwiteit benodig word, in die sintese van asparaginiel-tRNA.

Glutamiel-tRNA sintetase van *E. coli* vertoon weer ander eienskappe (Lapointe, *et al.,* 1972). Deur iso-elektriese fokusering kon hulle die ensiem in twee polipeptiedkettings skei: (i) Die kernensiem (molekulêre massa 56 000 dalton) kataliseer ATP-PPi uitwisseling sowel as die amino-asilering van $tRNA^{Glu}$. Dit het dieselfde spesifisiteit vir tRNA's en aminosure as die hele ensiem. (ii) 'n Polipeptiedketting (molekulêre massa 46 000 dalton) wat geen ensimatiese aktiwiteit vertoon nie. Hierdie peptied verlaag die Km-waarde van die kernensiem vir glutamaat (15-voudig) en vir ATP (6-voudig) terwyl dit die Km vir $tRNA^{Glu}$ tweevoudig verhoog.

Uit bg. lyk dit asof aktiveringsensieme se molekulêre konformasie wel in noue verband met hul aktiwiteit staan, en dit verskaf 'n moontlikheid om hul aktiwiteit as sodanig te reguleer.

1.2.4 Intrasellulêre verspreiding van aktiveringsensieme

Dit word algemeen aanvaar dat die aktiveringsensieme vry in die sitoplasma van die sel, ongebonde ronddryf. Die meeste aktiveringsaktiwiteit word dus in die oplosbare fraksie van selle gekry, en benewens 'n mitochondriale ensiem (Barnett, *et al.*, 1967) is hierdie groep ensieme nie partikulêr- of membraangebonde nie.

Bandyopadhyay en Deutscher (1971) was egter in staat om, na versigtige homogenisasie, 'n hoë molekulêre gewig-kompleks uit die hoë supernatant van rotlewer te isoleer, wat al die amino-asiel-tRNA sintetases en 'n groot gedeelte van die tRNA van die sel bevat. Hulle spekuleer dat die sogenaamde „oplosbare" komponente in die proteïensintesemasjinerie in hoogs-georganiseerde strukture in die sel voorkom, en dat hierdie strukture tydens homogenisasie en verdunning grootliks vernietig word. Soortgelyke resultate is deur Vennegoor en Bloemendal (1972) en Vennegoor, Stols en Bloemendal (1972) gevind. Hulle kon glutamiel-, isoleusiel-, leusiel-, lisiel- en methioniel-tRNA sintetases as 'n kompleks met 'n 18 S sedimentasiekonstante uit 'n namikrosomale fraksie van rotlewer isoleer. Hierdie kompleks is verbasend stabiel aangesien dit die volgende skeidings-tegnieke kan weerstaan: gelfiltrasie op Sephadex G200, chromatografie op DEAE-Sephadex A50 en hidroksiapatiet, sentrifugering in sukrose digtheidsgradiënte en iso-elektriese fokusering.

Kompartementasie van die sel kom al hoe meer na vore, sodat die sel baie meer kompleks is, as net 'n sak waarin die „oplosbare" komponente nie spesifiek gerangskik is nie.

HOOFSTUK 2

ONTWIKKELING VAN METODES

2.1 Inleiding

Voordat die eienskappe van ensieme met reg bestudeer kan word, is dit noodsaaklik om metodes te standardiseer waarvolgens die ensiemaktiwiteit kwalitatief en kwantitatief bepaal kan word. Gewoonlik word die reaksie soos dit *in vivo* plaasvind, *in vitro* vir die ensiembepaling gebruik, maar soms word ander reaksies ook gebruik. Vir 'n kwalitatiewe analise van ensiemaktiwiteit is die kondisies nie so krities nie, maar om ensiemaktiwiteit te kwantiseer moet die ensiemaktiwiteit die enigste beperkende faktor in die bepalingsreaksie wees. Vir bg. om te geld moet die reagense en kondisies sodanig wees, dat daar 'n lineariteit tussen ensiemaktiwiteit en ensiemkonsentrasie bestaan.

Drie metodes vir die bepaling van fenielalaniel-tRNA sintetase aktiwiteit is in hierdie studie gestandardiseer en gebruik. Loftfield (1972) het hierdie drie metodes baie goed saamgevat in 'n oorsigsartikel. Elkeen sal egter kortliks bespreek word.

2.1.1 Esterifikasie van eksogene tRNA

Hierdie bepaling berus op die voorgestelde *in vivo* reaksie:

$$AA_1 + ATP + Ensiem_1 \underset{}{\overset{Mg^{++}}{\rightleftharpoons}} Ensiem_1\text{----}AA_1AMP + PPi$$

$$Ensiem_1\text{----}AA_1AMP + tRNA^1 \rightleftharpoons AA_1tRNA^1 + AMP + Ensiem_1$$

Radioaktiewe aminosure word gebruik, sodat die hoeveelheid amino-asiel-tRNA bepaal kan word. Daar is egter baie faktore wat in ag geneem moet word by die interpretasie van resultate. Die bron waarvan die eksogene tRNA afkomstig is kan 'n rol speel, veral omdat die aard en konsentrasies van isovorms van tRNA in verskillende spesies en organe van mekaar verskil. Die ensiemvoorbereidings mag nukleases bevat wat die akseptoraktiwiteit van die tRNA kan vernietig. Soute, basisse, buffers en organiese oplosmiddels kan ook ensiem- en tRNA-akseptoraktiwiteit grootliks beïnvloed.

2.1.2 Die Hidroksamaatvorming

Hidroksielamien (NH_2OH) reageer met enige karboksielgeaktiveerde groep by neutrale of lig-alkaliese pH. Hierdie feit word in die bepaling gebruik, deurdat die karboksielgroep van

die aminosuur in die amino-asieladenilaat-ensiemkompleks, wat 'n voorgestelde intermediêr in die *in vivo* reaksie is, volgens die begrippe van Lipmann (1941), geaktiveer is.

$$\text{Ensiem}_1 + \text{ATP} + \text{AA}_1 \xrightleftharpoons{Mg^{++}} \text{Ensiem}_1\text{----}\text{AA}_1\text{AMP} + \text{PPi}$$

$$\downarrow + \text{NH}_2\text{OH}$$

$$\text{AA}_1\text{–NHOH}$$

Die reaksietempo van hierdie reaksie is egter nie onafhanklik van die hidroksielamienkonsentrasie nie. Dit is bv. aangetoon dat die reaksietempo eweredig is met die vierkant van die hidroksielamienkonsentrasie (Loftfield en Eigner, 1968). Daar is ook 'n konstante verbruik van substrate en 'n ophoping van produkte sodat die reaksietempo mettertyd afneem. Die oorspronklike bepaling wat op 'n $FeCl_3$ kleurreaksie berus (Hoagland, 1955), is baie onsensitief. Meer onlangs is radioaktiewe aminosure gebruik en is die hidroksamaat d.m.v. ioon-uitruilerpapier van die ongereageerde aminosuur geskei (Loftfield en Eigner, 1963), wat die bepalings baie meer sensitief en herhaalbaar maak.

2.1.3 Die ATP-PPi uitwisseling

Aangesien die eerste stap in die *in vivo* reaksie omkeerbaar is, kan hiervan gebruik gemaak word om radioaktiewe fosfaat in die vorm van pirofosfaat by 'n reaksiemengsel te voeg en dan die inbou van radioaktiewe fosfaat in ATP na te gaan.

$$\text{AA}_1 + \text{ATP} + \text{Ensiem}_1 \xrightleftharpoons{Mg^{++}} \text{Ensiem}_1\text{----}\text{AA}_1\text{AMP} + \text{PPi}$$

$$\upharpoonleft\downharpoonright \; [^{32}\text{P}]\text{PPi}$$

$$\text{Ensiem}_1 + \text{AA}_1 + [^{32}\text{P}]\text{ATP}$$

Kinetiese analise dui daarop dat die tempobepalende stap in bg. reaksie die vorming van die amino-asieladenilaat is, en dat die omkeerbare vorming en vrylating van ATP effektief onmiddellik plaasvind (Loftfield, 1972). Die ATP word gewoonlik na die reaksie van die pirofosfaat geskei deur absorpsie op geaktiveerde houtskool (Berg, 1956). In baie gevalle is hierdie 'n baie sensitiewe bepaling, aangesien hierdie reaksie gewoonlik 10 tot 100 maal vinniger plaasvind as die ander reaksies van die ensiem, en [^{32}P] PPi met 'n baie hoë spesifieke aktiwiteit beskikbaar is. Daar is ook geen netto verandering in die konsentrasies van substrate en produkte nie. Een groot nadeel van hierdie bepaling is die hoë agtergrond wat verkry word wanneer met onsuiwer ensiemvoorbereidings gewerk word, veral omdat

daar baie ander ensieme (en hul substrate) teenwoordig is wat ook hierdie reaksie kataliseer. In Hoagland (1955) se oorspronklike ontdekking van die aminosuuraktiveringsensieme het die byvoeging van 20 aminosure die inkorporasie van ^{32}P in ATP slegs met 'n faktor van 3 verhoog. Hierdie bepaling verloor dus 'n mate van sensitiwiteit wanneer die ensiem nie suiwer is nie.

2.2 Metodes

2.2.1 Die isolering van 'n gekonsentreerde oplosbare proteïenfraksie van hartselle

Rothartfraksies is verkry volgens prosedures soos voorgestel deur Dr. R. Zak, Universiteit van Chicago, in 'n persoonlike kommunikasie. Die hele prosedure, tensy anders vermeld, is by 0 – 4°C uitgevoer. Vars hartspier is in klein stukkies gesny, 2 maal vir 10 min. lank elk in 10 volumes (w/v) Buffer I (0,1 M KCl, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM EGTA, 5 mM Natriumfosfaat; pH 6,8) gewas en in 10 volumes (w/v) Buffer II [0,25 M Sukrose (RNase vry), 0,05 M KCl, 5 mM EGTA, 1 mM Natriumfosfaat, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM D.T.T.; pH 6,8] gehomogeniseer vir 10 sekondes lank by halfmaksimale spoed van 'n Ultra-turrax homogeniseerder. Partikulêre materiaal is verwyder deur sentrifugasie in die koue, eerstens vir 10 min. by 15 000g, dan vir 20 min. by 30 000g en ten slotte vir 100 min. by 105 000g. Die uiteindelike supernatant is die S100 fraksie genoem. Soliede ammoniumsulfaat (50 gm/100 ml) is stadig oor 'n tydperk van 15 min. by die yskoue S100 fraksie gevoeg terwyl daar gedurig geroer is. Die gevormde presipitaat is verkry deur sentrifugasie vir 20 min. by 30 000g en opgelos in 'n minimum volume Buffer C (0,25 M Sukrose, 0,05 M KCl, 50 mM triëthanolamien, 1 mM D.T.T., 5 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA; pH 7,6). Dié oplossing is daarna deur 'n kolom van Sephadex G50 (25 cm X 1 cm, „void" volume 6,0 ml) gestuur om aminosure en soute te verwyder, voordat dit by –180°C gestoor is.

2.2.2 Voorbereiding van soutvrye en neutrale Hidroksielamien

Hidroksielamien-HCl is geneutraliseer en ontsout volgens die metode van Beinert, *et al.* (1953): 56gm NH_2OH-HCl is in 'n groot mortier fyngemaak, en daarna is 100 ml. absolute metiel-alkohol bygevoeg. Die gevormde pasta is vir nog 'n verdere 5 min. gemeng. 'n 30% KOH-oplossing in metiel-alkohol (w/v) is stadig bygevoeg, terwyl gedurig geroer is, totdat 'n 1:10 verdunning 'n pH van 7,5 – 8,0 op pH-papier gelewer het. Die pasta is toe op 'n Buchner tregter deur filtreerpapier (Whatman Nr. 541) gefiltreer, en die mortier met 'n verdere 100 ml. metiel-alkohol uitgewas en ook gefiltreer. Die filtraat is toe verkoel tot 0 – 4°C. Van anhidriese Na_2SO_4 is 200 gm bygevoeg en die sout weer deur filtrasie

verwyder, na 2 – 3 uur by 0 – 4°C. Die filtraat is in 'n vakuumverdamper by 37°C tot 'n dun stroop gekonsentreer. Die pH van hierdie stroop was in alle gevalle ongeveer neutraal, sodat die konsentrasie daarvan nie deur titrasie bepaal kon word nie; hierdie NH_2OH is net so in die ensiembepalings gebruik. Die beraamde konsentrasie was 20 M.

2.2.3 Isolasie en deasilering van rotspier-tRNA

Hierdie isolasie is uitgevoer volgens Herrington en Hawtrey (1970). Enige nie-partikulêre oplosbare fraksie (bv. pH_5-ensiem of S100) van dwarsgestreepte spiere kon gebruik word. By hierdie fraksie is 'n gelyke volume 90% fenol (oor sink in die teenwoordigheid van N_2-gas gedistilleer) in water wat 1% SDS (w/v) bevat, gevoeg en vir 90 min. by kamertemperatuur geskud. Die gevormde emulsie is gebreek deur lae-spoed sentrifugasie vir 20 min. by 2 000g (kamertemperatuur). Die boonste waterige fase is versigtig verwyder en die tRNA in hierdie waterfase gepresipiteer met 0,1 volume 20% kaliumasetaat (w/v) en 2,5 volumes 95% etielalkohol, by –15°C vir 16 uur. Die gepresipiteerde tRNA is deur sentrifugasie herwin.

Deasilering van tRNA is uitgevoer soos beskryf deur Sarin en Zamecnik (1964), deur die tRNA in 1,8 M Tris-HCl; pH 8,0, by 37°C te inkubeer. Hierna is die kaliumasetaat-etielalkohol presipitasie herhaal. Na herwinning van die gepresipiteerde tRNA is dit in gedistilleerde, gedeïoniseerde water opgelos en vir 6 – 8 uur teenoor 1 000 volumes van hierdie water gedialiseer.

2.2.4 Ensiembepalings

2.2.4.1 Die vorming van ^{14}C-fenielalaniel-tRNA

Elke 0,1 ml reaksiemengsel (pH 7,6) het die volgende bevat: 0,1 M Tris-HCl, 0,01 M $MgCl_2$, 0,01 M KCl, 0,002 M ATP, 0,0025 M PEP, 0,2 mM D.T.T., 10 μg piruvaatkinase, 0,08 mg gedeasileerde spier tRNA (konsentrasie bepaal volgens $E_{1\,cm}^{1\%} = 170$ by 260 mμ van bereiding 2.2.3), 10 μg anorganiese pirofosfatase, 0,5 μCi ^{14}C-L-fenielalanien (492 mCi/mMol) en 'n minimum hoeveelheid ensiem (in hierdie geval die behandelde ammoniumsulfaatpresipitaat van die oplosbare proteïene van rothartselle soos beskryf in 2.2.1) Hierdie reaksiemengsel is by 37°C geïnkubeer en die reaksie is gestop deur die hele mengsel op 'n Whatman 3 MM filterskyfie te bring en in yskoue 10% TCA (w/v) te dompel. Die bepaling van TCA-presipiteerbare radioaktiwiteit op die filters is gedoen volgens Novelli en Mans (1961). Na 'n minimum tydperk van 'n ½ uur in die koue 10% TCA, is die filters vir 15 min. lank gewas in 5% TCA, by kamertemperatuur. Die filters is

daarna oorgebring na eter: etielalkohol, 1:1 vir 15 min. by kamertemperatuur en daarna in vars eter: etielalkohol, 1:1 by 37°C vir 'n ½uur. Daarna is die filters met eter gewas, en toegelaat om droog te word. Die monsters is in 'n Packard Tri-carb vloeistof-scintillasie spektrometer getel in telflessies wat 5 ml. 10% Fluoralloy in tolueen bevat.

2.2.4.2 Die vorming van ^{14}C-L-fenielalanien-hidroksamaat

Hierdie bepaling is met wysigings gedoen volgens Loftfield en Eigner (1963). 'n Minimum hoeveelheid ensiembereiding, verkry soos beskryf in 2.2.1, is gemeng met 0,015 M $MgCl_2$, 0,015 M D.T.T., 0,002 M ATP, 0,0025 M PEP, 10 μg piruvaatkinase, ongeveer 1 M NH_2OH (ontsout en geneutraliseer soos beskryf in 2.2.2), 10 μg anorganiese pirofosfatase en 1,25 μCi ^{14}C-L-fenielalanien (492 mCi/mMol) – alles in 0,1 ml. Na inkubasie by 37°C is die reaksie gestop deur die mengsel vir 30 sekondes in 'n kokende waterbad te plaas. Na sentrifugasie in 'n Beckman Microfuge 152 is die supernatant oorgebring op 'n CM82 papierstrokie (4 cm X 13 cm). Ontwikkeling is in 0,005 M Natriumfosfaatbuffer, pH 6,2 uitgevoer. Na droging (110°C vir 10 min.) van die chromatogram kon die radioaktiewe fenielalanien-hidroksamaat d.m.v. 'n Nuclear-Chicago Actigraph III gasvloeiteller opgespoor, uitgeknip en soos die filterskyfies (2.2.4.1) getel word.

2.2.4.3 [^{32}P] ATP-PPi uitwisseling

Hierdie bepaling is gedoen volgens die metode van Calender en Berg (1966). 'n Minimum hoeveelheid ensiem (berei soos beskryf in 2.2.1) is by 37°C en pH 7,8 geïnkubeer met 0,125 M triëtanolamien, 0,0125 M $MgCl_2$, 0,0025 M ATP, 0,0005 M EDTA, 0,002 M tetranatriumpirofosfaat, 0,01 M KF, 5 μCi dinatriumdihidrogeenpirofosfaat-^{32}P (18,9 mCi/mMol) en 0,4 mM volledige aminosuurmengsel of 5 mM van 'n enkele aminosuur, alles in 0,1 ml. Die reaksie is gestop deur die byvoeging van 0,25 ml van 'n 2,5% suurgewaste Norit A houtskool in 0,1 M tetranatriumpirofosfaat, 0,8% $HClO_4$ en 6 mM dinatriumfosfaat. Die gestopte reaksiemengsel is goed gemeng en vir minstens 15 min. op ys gelaat, waarna dit deur Whatman GF/C „glass fibre discs" gefiltreer is. Die presipitaat is gewas met 5 maal 5 ml water, 1 maal met 0,05 M tetranatriumpirofosfaat, pH 8,0 en laastens 2 maal met water. Die skyfies is 10 min. by 110°C gedroog en getel soos beskryf in 2.2.4.1.

2.2.5 Algemeen

Om ^{14}C t.p.m. te kwantiseer is gebruik gemaak van die kanaalverhoudingsmetode (Herberg, 1965) as 'n korreksiemetode vir blussing en vir die bepaling van die telopbrengs.

Proteïenkonsentrasies is in al die gevalle in hierdie studie bepaal volgens die metode van Lowry, *et al.* (1951).

2.3 Resultate en Bespreking

In die vorming van ^{14}C-fenielalanienhidroksamaat was dit eerstens nodig om 'n bevredigende metode daar te stel om die gevormde ^{14}C-fenielalanienhidroksamaat van die ongereageerde ^{14}C-fenielalanien te skei. Dit is gevind dat chromatografie op CM 82 papier met 0,005 M natriumfosfaatbuffer, pH 6,2, as ontwikkelingsbuffer sò 'n skeiding te weeg bring (fig. 2.1). Onder hierdie toestande, bly die ^{14}C-fenielalanienhidroksamaat by die oorsprong en die vry ^{14}C-fenielalanien beweeg saam met die vloeistoffront.
(Sien bl. 18).

Indien 'n ensiemaktiwiteitsbepaling gestandardiseer word t.o.v. 'n kwantitatiewe analise, moet die ensiem sover moontlik die enigste beperkende faktor in die reaksie wees. As dit wel so is, sal die ensiemaktiwiteit liniêr met tyd toeneem, en is 'n enkele tydpunt al wat nodig is vir 'n kwantitatiewe analise van die ensiemaktiwiteit.

Daar was egter geen liniariteit met die tyd, in die asilering van tRNA (fig. 2.2; sien bl. 19) en die hidroksamaatvorming (fig. 2.3; sien bl. 20) met ^{14}C-fenielalanien deur die oplosbare fraksie van rothartselle nie. Om hierdie probleem te oorbrug, is aanvanklike reaksietempo's bepaal deur die tangens van die hoek van die raaklyn aan die oorsprong van elke kromme te neem. Uit die figure is dit duidelik dat hierdie aanvanklike reaksietempo's liniêr toeneem met die proteïenkonsentrasie van die fenielalaniel-tRNA sintetase-bereiding.

Hierdie metode is deurgaans in die studie gebruik om fenielalaniel-tRNA sintetase-aktiwiteit volgens die asilering van tRNA en die hidroksamaatvorming kwantitatief te bepaal. Vir kwalitatiewe analise is slegs 'n enkele 20 min. tydpunt, in albei bg. metodes geneem.

Met die ATP-PPi uitwisseling is daar slegs 'n styging van die aminosuurafhanklike ATP-PPi uitwisseling met tyd verkry as 'n volledige aminosuurmengsel gebruik is (fig. 2.4). Met enkele aminosure het die aktiwiteit met en sonder die aminosuur met dieselfde tempo toegeneem, waarskynlik a.g.v. 'n oorskadu-effek van die baie ander ensieme in die voorbereiding. (Sien bladsy 21.)

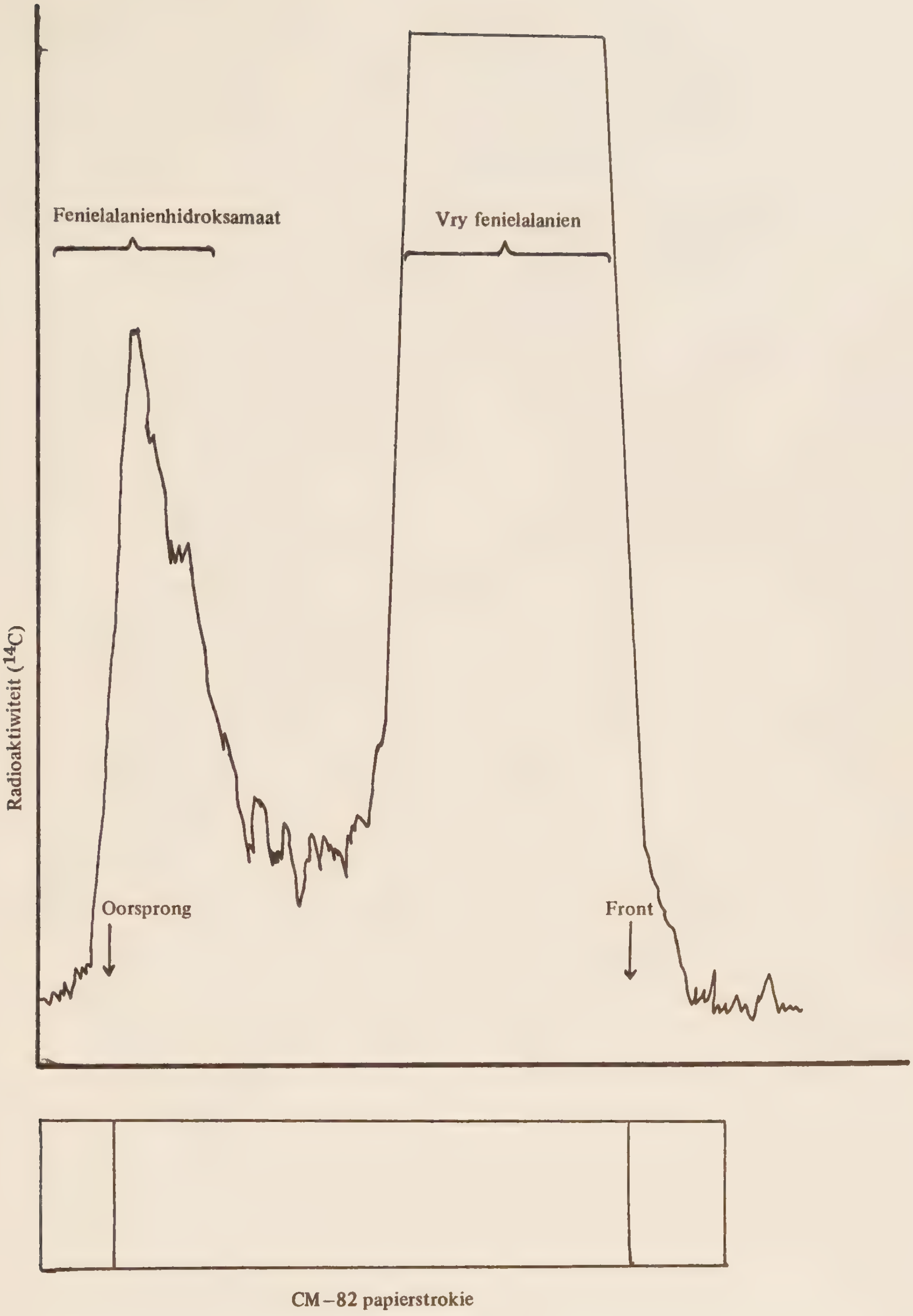
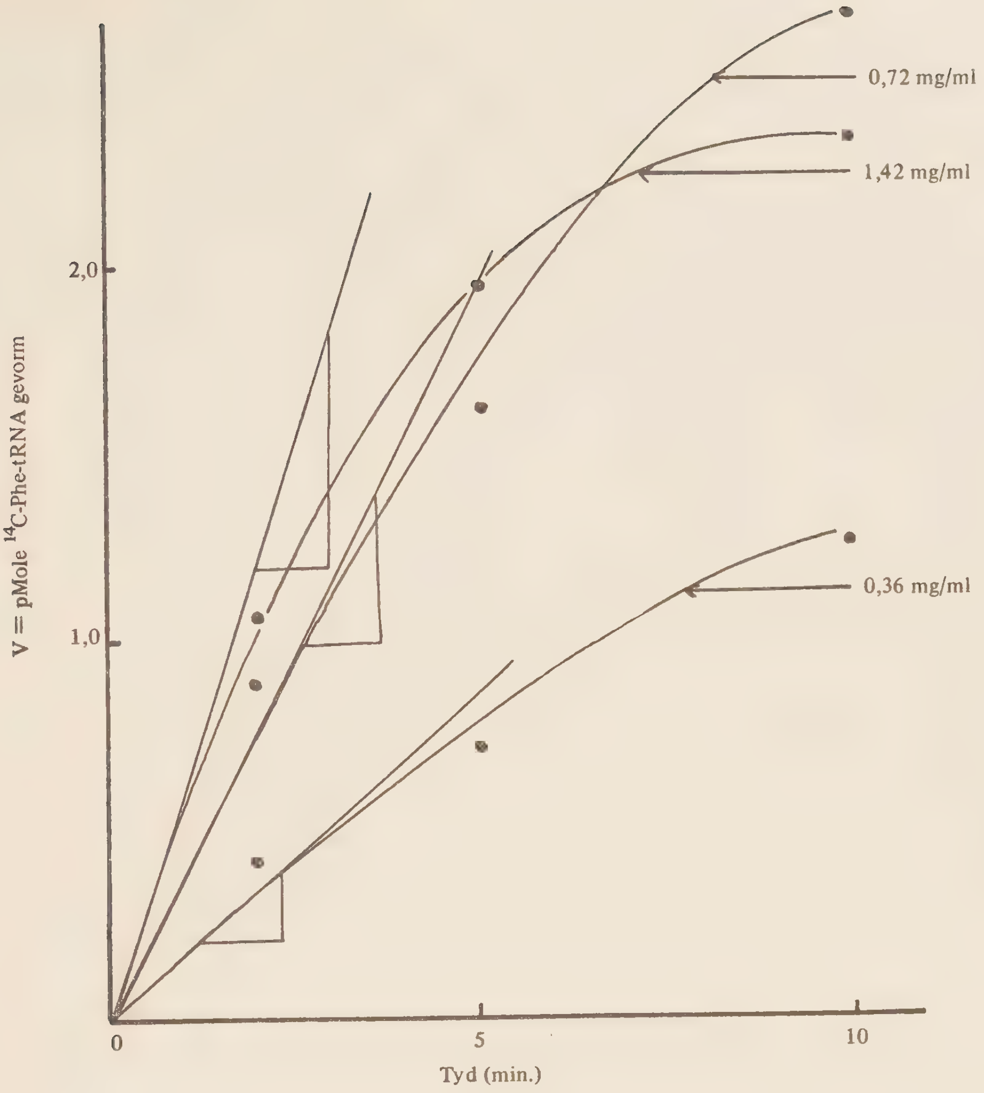


Fig. 2.1 Skeiding van gevormde fenielalanienhidroksamaat en ongereageerde fenielalanien d.m.v. CM82 papier-chromatografie (vir besonderhede sien 2.2.4.2)



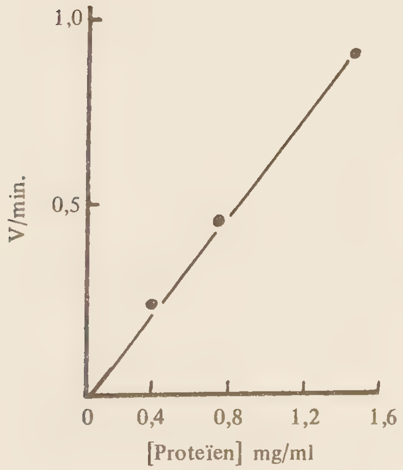


Fig. 2.2 Amino-asilering van spier-tRNA deur rothart sarkoplasmiese ekstrak. Besonderhede is in 2.2.4.1 beskryf.

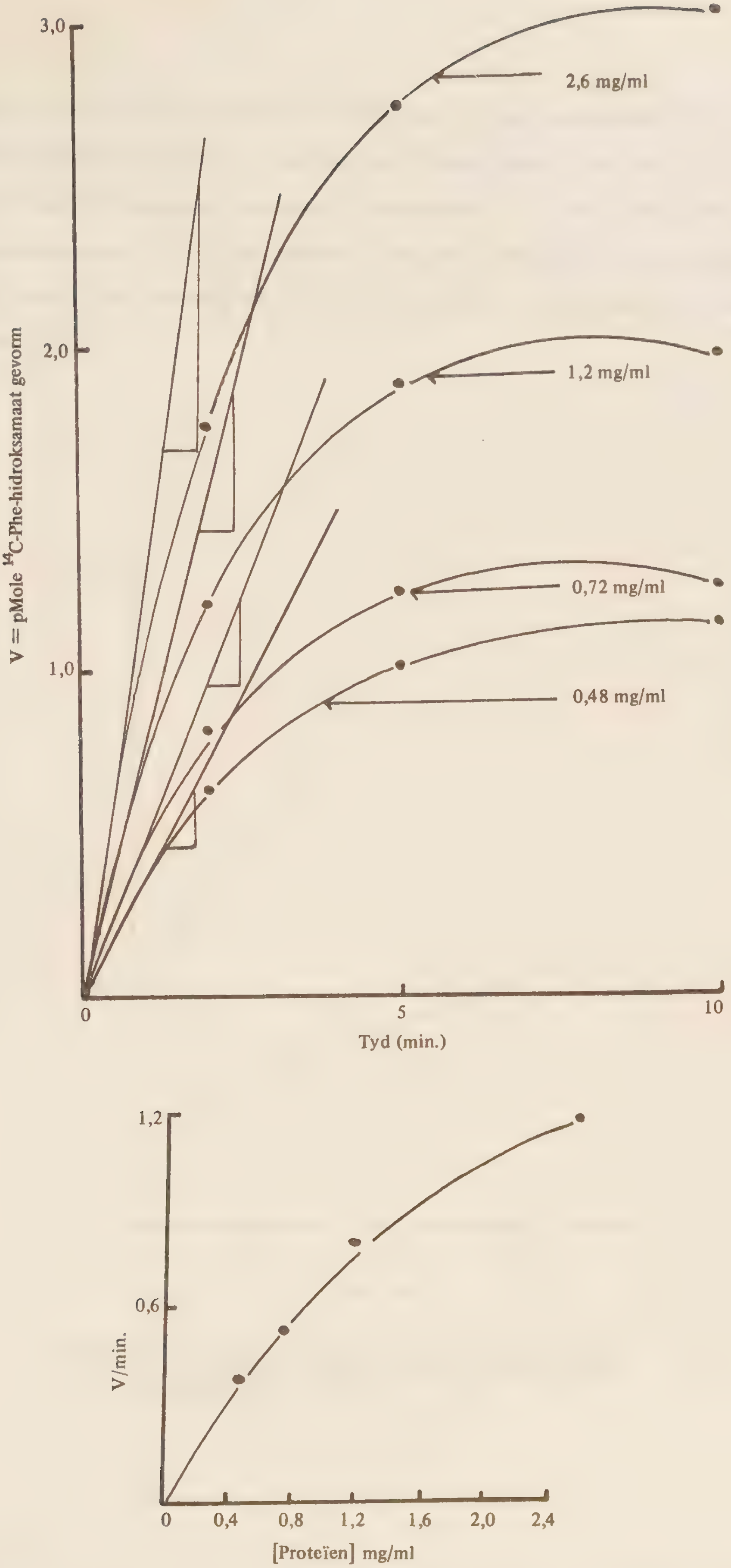


Fig. 2.3 Vorming van ^{14}C-aminosuurhidroksamaat deur rothart sarkoplasmiese ekstrak. Besonderhede is in 2.2.4.2 beskryf.

Asilering van tRNA en die vorming van hidroksamate deur fenielalaniel-tRNA sintetase is dus gestandardiseer en die moontlikheid om fenielalanien-afhanklike ATP-PPi uitwisseling in meer suiwer fraksies te ondersoek, is daargestel. Dit is noodsaaklik om te let dat hidroksamaatvorming en ATP-PPi uitwisseling slegs die aanvanklike aktiveringstap van die reaksie toets, terwyl die asilering van tRNA die aktiwiteit van die ensiem t.o.v. die hele *in vivo* reaksie nagaan.

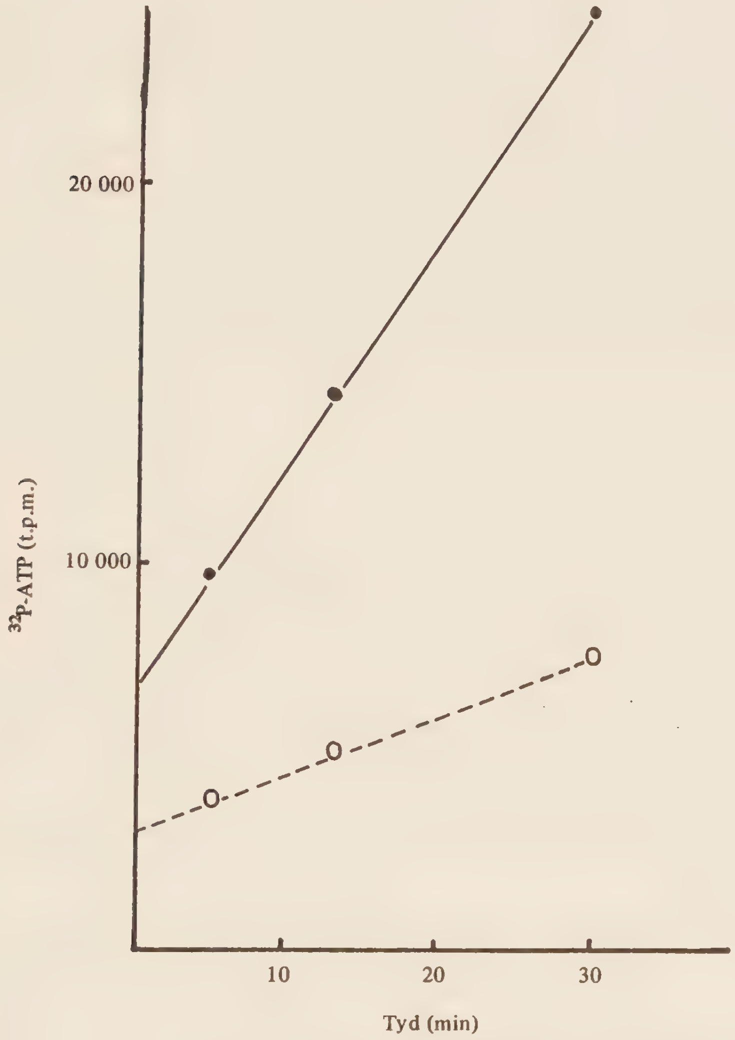


Fig. 2.4 ATP-^{32}P-PPi uitwisseling in die teenwoordigheid (● —— ●) en afwesigheid (O - - - O) van 'n volledige aminosuurmengsel. Besonderhede is in 2.2.4 beskryf.

HOOFSTUK 3

FENIELALANIEL–tRNA SINTETASE VAN HARTSELLE

3.1 Inleiding

In hoofstuk 1 is die verband tussen aminosuuraktivering en proteïenbiosintese beklemtoon, en veral die regulerende rol wat hierdie groep ensieme kan speel. Dit word ook al hoe meer duidelik dat die prosesse waardeur die selspesifieke organisasie van proteïene te weeg gebring word, baie kompleks en topografies dispers moet wees. Die belangrikheid van hierdie primêre aktiveringsreaksies is dus duidelik in die selstrukturele konteks.

Die verspreiding en aktiwiteit van die aktiveringsensieme kan dus tot 'n hoë mate die lokalisasie en mate van proteïensintese bepaal. Met hierdie doel voor oë is fenielalaniel-tRNA sintetase gekies om die aktiveringsproses in hartselle na te gaan. Daar is ook gepoog om die molekulêre konfigurasie van fenielalaniel-tRNA sintetase na te gaan, om sodoende die reaksiemeganisme en aktiwiteit van hierdie ensiem beter te evalueer.

3.2 Metodes

3.2.1 Fraksionering van rotharthomogenate

Alle stappe is by 0 – 4°C uitgevoer. Na homogenisasie soos beskryf in 2.2.1, is die volgende hartfraksies verkry:

(i) Selbrokstukke en ongebreekte selle as die sediment van 'n 1 500 g sentrifugering vir 10 min.

(ii) Na die sentrifugasie van die supernatant (i) by 30 000 g vir 20 minute 'n mitochondriale fraksie.

(iii) Die supernatant verkry in (ii) is vir 100 min. by 105 000 g gesentrifugeer om 'n mikrosomale sediment en 'n S100 supernatant te verkry.

(iv) Die S100 fraksie is met $(NH_4)_2SO_4$ gekonsentreer soos beskryf in 2.2.1.

Al bg. sedimente is in 'n minimum volume van Buffer C opgeneem en suspensies van subsellulêre partikels (ii en iii) sowel as die sediment van (i), is met 'n Biosonik IV (Bronwill) vir 10 sekondes elk op 20, 40, 60 eenhede op die „Lo" stand, in gebreekte ys gesonikeer. Aminosure en soute is vervolgens deur Sephadex G50 chromatografie (sien 2.2.1), of deur dialise vir 16 uur teenoor Buffer C (1 000 volumes), verwyder.

Fenielalaniel-tRNA sintetase is kwantitatief volgens die asilering van tRNA en hidroksamaatvorming geanaliseer, soos beskryf in hoofstuk 2.

3.2.2 Liniêre Sukrose digtheidsgradiënt-sentrifugering

'n Ensiemfraksie, berei soos beskryf in 2.2.1 (2 mg. proteïen opgelos in 0,15 ml. Buffer C sonder sukrose), is versigtig as 'n laag op 4,8 ml. van 'n 3 – 15% liniêre sukrose digtheidsgradiënt, in Buffer C, aangebring. Sentrifugering is by 180 000 g vir 6 uur in die koue uitgevoer in 'n SW65Ti rotor in 'n L4 Ultra-sentrifuge (Beckman Instruments). 0,25 ml fraksies is na die sentrifugering van onder uit die buis versamel deur 'n gaatjie onder in die buis te maak. Die fraksies is kwalitatief vir fenielalaniel-tRNA sintetase geanaliseer volgens al drie ensiemaktiwiteitsbepalingsmetodes, beskryf in hoofstuk 2.

Deur van merkerensieme, katalase (244 000 dalton) en gis-alkoholdehidrogenase (150 000 dalton) gebruik te maak, is die molekulêre massas van komponente in die gradiënt bepaal volgens die metode van Martin en Ames (1961). Die aktiwiteit van gis-alkoholhidrogenase is bepaal volgens die metode van Vallee en Hoch (1955) waar die tempo van toename in absorpsie by 340 mμ gemeet word (alkoholdehidrogenase kataliseer die reaksie:

$$R\text{-}CH_2OH + NAD \rightleftharpoons RCHO + NADH_2).$$

Die aktiwiteit van katalase is bepaal volgens die metode van Beers en Sizer (1952), waar die verdwyning van peroksied spektrofotometries by 240 mμ gevolg is in die reaksie:

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{Katalase}} 2H_2O + O_2$$

3.2.3 Differensiële sout-fraksionering van fenielalanien-aktiveringsensiem

'n S100 fraksie is verkry soos beskryf in 3.2.1 (11 mg/ml, pH 6,0), behalwe dat homogenisasie in 2 volumes Buffer II (w/v) uitgevoer is. Terwyl dit die hele tyd op ys (0°C) geroer is, is soliede $(NH_4)_2SO_4$ baie stadig bygevoeg om die verskillende grade van versadiging te lewer. Presipitate is ná sentrifugasie opgelos in 'n minimum volume Buffer C en vir 16 uur in die koue teenoor Buffer C (1 000 volumes) gedialiseer. Fenielalaniel-tRNA sintetase aktiwiteit is kwalitatief volgens die asilering van tRNA en hidroksamaatvorming in die fraksies geanaliseer (hoofstuk 2).

3.2.4 Algemeen

Dunlaagchromatografie is op voorafbedekte Silica gel-G plate gedoen deur ontwikkeling in n-Butanol: Mieresuur: Water (75 : 15 : 10, v/v/v) (Hirsh en Lipmann, 1968). CM-sellulose papier-chromatografie is op dieselfde wyse uitgevoer as in die hidroksamaatvormings-

aktiwiteitsbepaling (hoofstuk 2). Radioaktiwiteit is op die chromatogramme bepaal deur dit in cm stroke te knip en die droë monsters te tel soos beskryf in 2.2.4.2.

Eluasie van fenielalanien-hidroksamaat vanaf die CM-sellulose is gedoen d.m.v. 2 ml 10 mM Tris-HCl, pH 8,0.

Die hidroksamaatproduk is gehidroliseer in teenwoordigheid van 1 N HCl vir 60 min by 100 °C.

3.3 Resultate en Bespreking

Fraksie	% van totale phe-tRNA sintetase aktiwiteit	
	Asilering van tRNA	Hidroksamaatvorming
Selbrokstukke en ongebreekte selle	55	42
Mitochondriale fraksie	3	5
Mikrosomale fraksie	3	2
Oplosbare fraksie	39	51

Tabel 3.1 Die distribusie van fenielalaniel-tRNA sintetase in 'n rothart-voorbereiding

Fenielalaniel-tRNA sintetase aktiwiteit is in alle hartfraksies gevind (Tabel 3.1). Die relatiewe hoë aktiwiteit van die selbrokstukke en ongebreekte selle, na sonikasie, dui op 'n groot aantal ongebreekte selle na homogenisasie. Die aktiwiteit in die mitochondriale fraksie het alleen na sonikasie na vore gekom, en kan toegeskryf word aan 'n mitochondriale ensiem (Barnett, *et al.*, 1967). Die aktiwiteit in die mikrosomale fraksie het waarskynlik sy oorsprong in kontaminasie met die oplosbare fraksie. Die meeste aktiwiteit is in die oplosbare fraksie gevind en hierdie ensiem is verder ondersoek.

Aanvanklik was die belangstelling in die moontlikheid van amino-asiel-tRNA komplekse (Vennegoor en Bloemendal, 1972; Bandyopadhyay en Deutscher, 1971). Vir hierdie doel is die oplosbare fraksie aan sukrose digtheidsgradiëntanalise onderwerp (fig. 3.1; bl. 25).

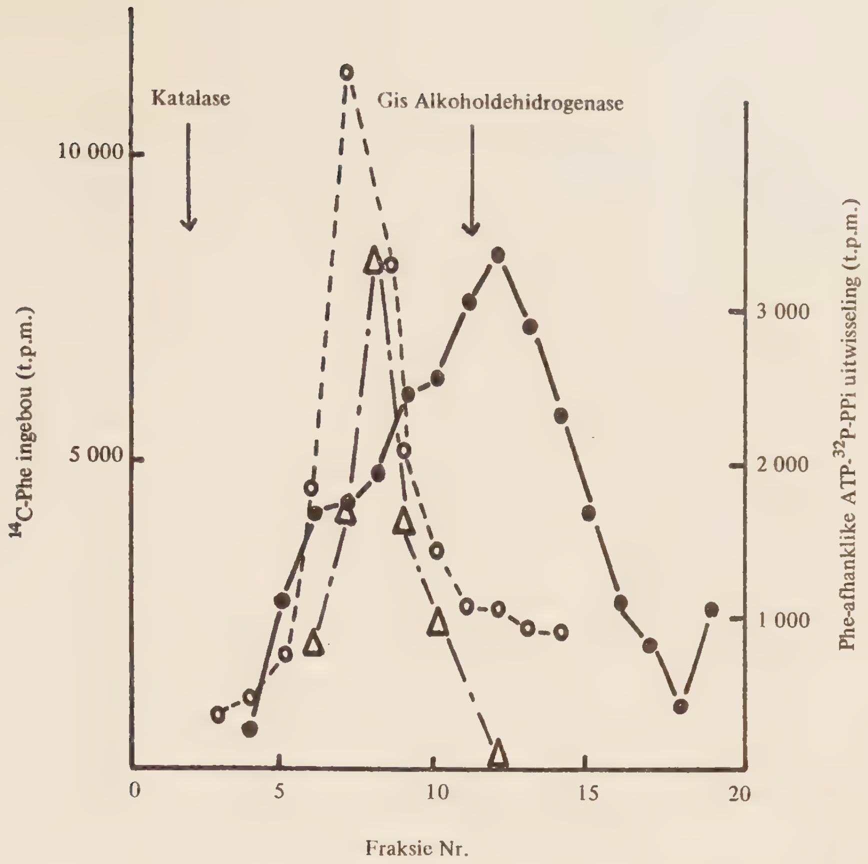


Fig. 3.1 *Differensiële sedimentasie van fenielalanienaktiveringsensiem in 'n liniêre sukrose digtheidsgradiënt*
● —— ● asilering van tRNA met ^{14}C-phe
O - - - O vorming van ^{14}C-phe-hidroksamaat
Δ-·-Δ phe-afhanklike ATP-^{32}P-PPi uitwisseling

Die posisie van merkerproteïene word aangetoon.
Besonderhede is in 3.2.2 beskryf.

Die aktiwiteit betrokke in die vorming van fenielalanienhidroksamaat en die fenielalanien-afhanklike ATP-PPi uitwisseling het insiggewend dieper in die gradiënt as die breër feniel-alaniel-tRNA-vormingsaktiwiteit inbeweeg. Lg. het egter 'n effense skouer in die gebied van die ander aktiwiteit getoon. Die molekulêre massas van die twee ensieme is bepaal as 194 000 en 150 000 dalton respektiewelik (Martin en Ames, 1961). Identiese resultate was verkry indien gis-tRNA i.p.v. spier-tRNA gebruik is. Die aanduiding is dus daar dat fenielalanienaktiveringsensiem uit twee molekulêre vorms bestaan, waarvan die een swaarder vorm (E_A) hoofsaaklik die primêre aktiveringsreaksie van fenielalanien uitvoer en baie minder aktief t.o.v. die hele reaksie soos uitgevoer deur die ligter (E_T) vorm is. Wat ook verbasend is, is die feit dat E_T geredelik die volledige reaksie uitvoer maar relatief onaktief t.o.v. die aanvanklike aktiveringsreaksie soos uitgevoer deur E_A, is.

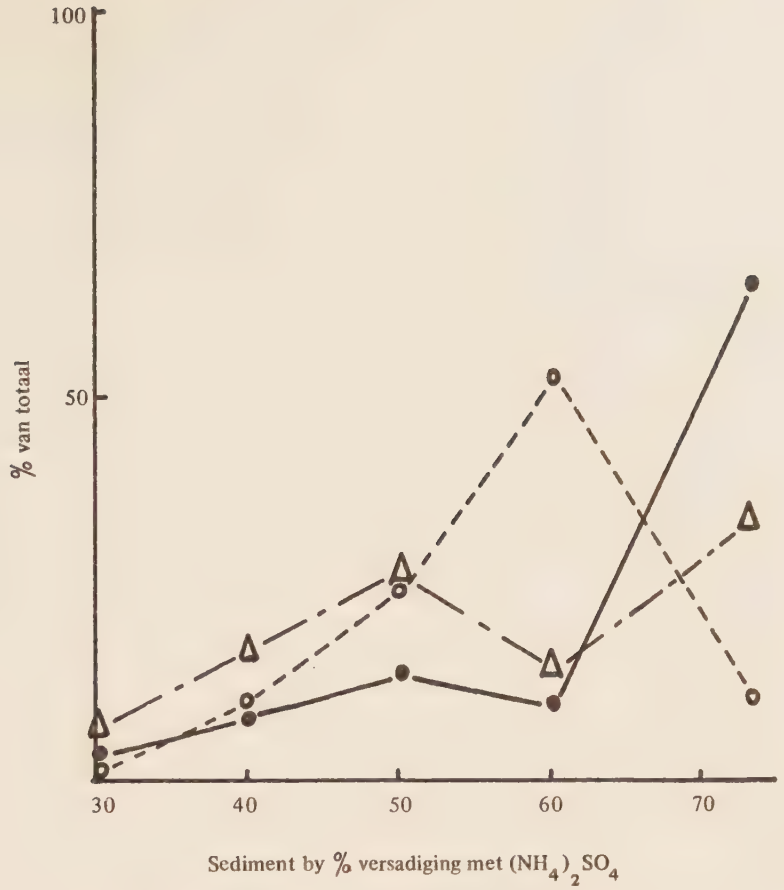


Fig. 3.2 *Differensiële soutfraksionering van phe-aktiveringsensiem. Besonderhede is in 3.2.3 beskryf.*
● —— ● asilering van tRNA met ^{14}C-phe
O - - - O vorming van ^{14}C-phe-hidroksamaat
Δ–· –Δ proteïen
Al die waardes is uitgedruk as % van die totaal.

'n Verdere bewys vir twee molekulêre vorms van fenielalanien-aktiveringsensieme is verkry deur differensiële $(NH_4)_2SO_4$ fraksionering (fig. 3.2) E_T presipiteer tussen 60 – 70% versadiging terwyl E_A maksimaal verkry is tussen 50 – 60% versadiging van die sout.

Aangesien die moontlikheid bestaan dat die hidroksamaatvorming en ATP-PPi uitwisseling ander reaksies as fenielalanien-adenilaatvorming meet (bv. die vorming van fenielasetiel-S-CoA waar fenielalanien omgesit word na fenielasetielglutamien wat deur 'n hele reeks intermediêre verloop voordat dit uiteindelik as fenielasetiel-S-CoA geaktiveer word – sien Meister 1965), is die produk na hidroksamaatvorming in twee chromatografiese sisteme ondersoek (fig. 3.3 en 3.4; bl. 27).

In fig. 3.3 het die produk van hidroksamaatvorming na suurhidrolise saam met fenielalanien beweeg. Dieselfde resultaat is verkry na dunlaagchromatografie (fig. 3.4). Dit kan dus met redelike sekerheid gesê word dat E_A wel die vorming van fenielalaniel-adenilaat kataliseer en nie die aktivering van ander metaboliese produkte van fenielalanien nie.

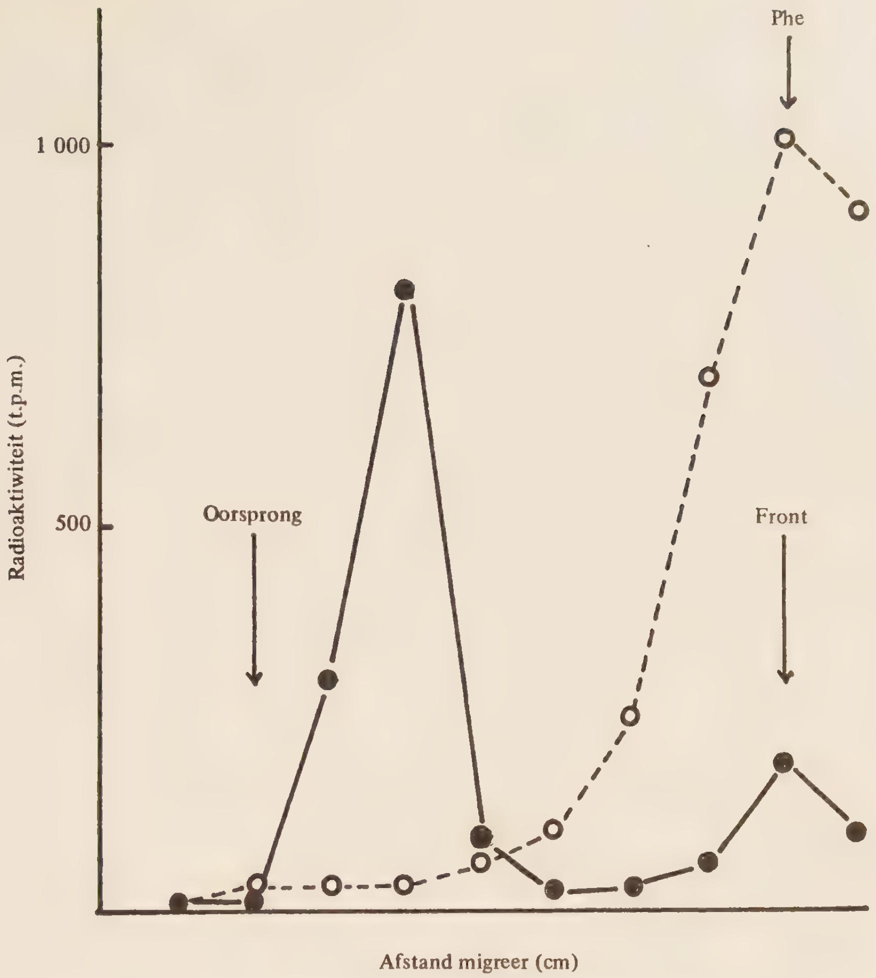


Fig. 3.3 CM 82-papierchromatografie van hidroksamaatproduk (sien 3.2.4), voor HCl-hidrolise (● —— ●) en daarna (O - - - O). Die posisie van fenielalanien word aangetoon.

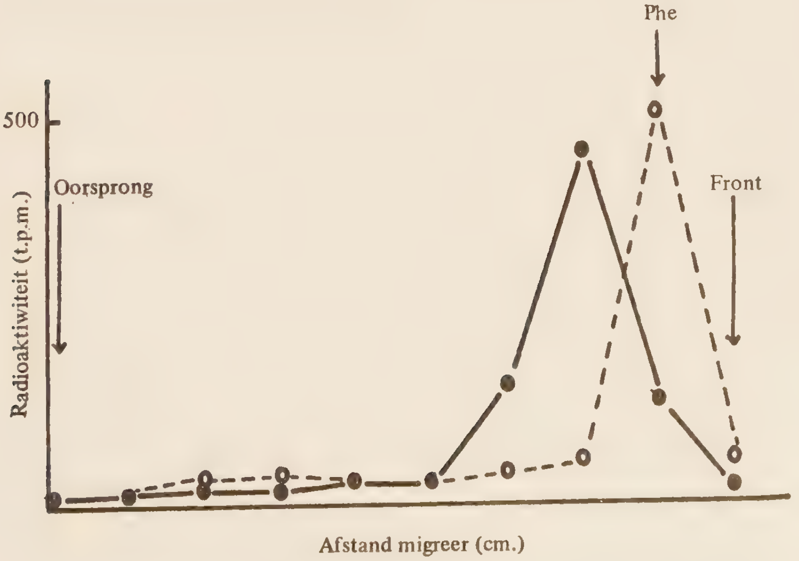


Fig. 3.4 Dunlaagchromatografie van hidroksamaatproduk voor HCl-hidrolise (● —— ●) en daarna (O - - - - O) (sien 3.2.4) Die posisie van phe is aangedui.

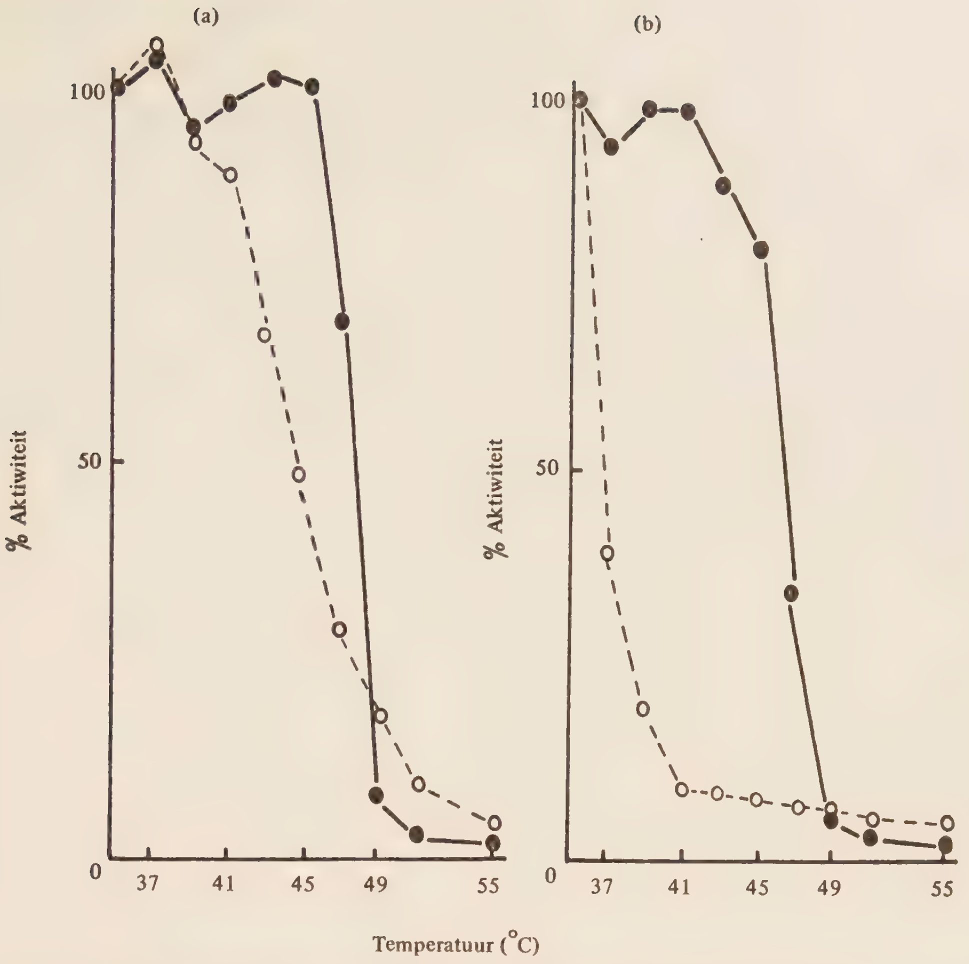


Fig. 3.5 *Effek van preïnkubasie by verskillende temperature in die teenwoordigheid (b) en afwesigheid (a) van sy substrate op phe-aktiveringsensieme. Die oplosbare fraksie, voorberei soos beskryf in 2.2.1 (12 mg/ml, proteïen), is vir 5 min. gepreïnkubeer by die temperature soos aangetoon, voordat dit na 4 °C verkoel is. Fenielalanienaktiveringensiemaktiwiteit is kwalitatief bepaal soos beskryf in 2.2.4 en is uitgedruk as % van die aktiwiteit van monsters gepreïnkubeer by 0 °C.*
● —— ● asilering van tRNA met ^{14}C-phe
O - - - O vorming van ^{14}C-phe-hidroksamaat.

Die temperatuurstabiliteit van die twee vorms in die afwesigheid (fig. 3.5(a)) en aanwesigheid (fig. 3.5(b)) van substrate (alle substrate behalwe radioaktiewe fenielalanien) verskil aanmerklik. Die gevoeligheid van E_A, vir temperature in die orde van 40 – 45°C, is aanmerklik meer as E_T. Hierdie verskynsel is veral prominent in gevalle waar die vorms in die teenwoordigheid van hul substrate gepreïnkubeer word.

Die resultate hier weergegee vertoon 'n oppervlakkige ooreenkoms met die verskynsel van leusiel-tRNA sintetase in *E. coli* soos gevind deur Rouget en Chapeville (1970, 1971(a), 1971(b), 1971(c)), behalwe dat die ensiem wat die aminosuur aktiveer, maar swak na tRNA oordra, groter is as die ander vorm en dus onwaarskynlik 'n proteolitiese produk van die ,,volledige" ensiem is. Hierdie tweevormverskynsel van fenielalanien-akti-

veringsensiem in rothartselle verskil ook aansienlik van die geval van glutamiel-tRNA sintetase in *E. coli* (Lapointe, *et al.*, 1972), waar die ensiemkern deur 'n polipeptied-ketting gemodifeer word, asook van die geval met asparaginiel-tRNA sintetase (Marshall en Davies, 1972) waar twee komponente vir volle ensimatiese aktiwiteit benodig word (sien hoofstuk 1).

Die E_T-vorm vertoon ook baie min ATP-PPi uitwisseling en hidroksamaatvorming, wat ooreenstem met die spermien-gestimuleerde amino-asileringsreaksie soos gekataliseer deur die isoleusien: tRNA- en valien: tRNA ligase van *E. coli*, wat blykbaar sonder die intermediêre vorming van amino-asieladenilaat, wat met PPi en hidroksielamien kan reageer, verloop (Igarashi, *et al.*, 1971 en 1972; Pastuszyn en Loftfield, 1972).

HOOFSTUK 4

UNIVERSALITEIT VAN E_A EN E_T VORMS VAN FENIELALANIEN–AKTIVERINGSENSIEM

4.1 Inleiding

Die basiese korrelasie tussen DNA, RNA en proteïene en die uitdrukking van genetiese materiaal is universieel in die biologiese wêreld. Daar is egter baie verskille in die toepassing van bg. basiese konsepte soos bepaal deur die behoeftes van die betrokke organisme of die betrokke orgaan (in hoër diere). Die verskille kom sterk na vore op die ensiemologiese vlak, en dan veral t.o.v. die regulering van ensiemaktiwiteit.

Die waarneming dat fenielalanien-aktiveringsensiem uit twee molekulêre vorms bestaan, (hoofstuk 3) het gelei tot die vraag van die universaliteit van hierdie verskynsel, t.o.v. spesie, orgaan en selfs ander sintetases, want dit sal kan lig werp op die belangrikheid daarvan. Dit is bekend dat amino-asiel-tRNA sintetases baie, t.o.v. spesifisiteit, molekulêre massas, substraataffiniteit, herkoms en reaksiesnelhede van mekaar verskil (Peterson, 1967). Dit is bv. ook aangetoon dat kondisies wat optimaal vir die aktiwiteitsbepaling van een ensiem, amper heeltemal ontoereikend t.o.v. ander sintetases van dieselfde sel is (Rubin, *et al.*, 1967).

4.2 Metodes

4.2.1 Voorbereiding van ekstrakte

Om die twee vorms van fenielalaniel-tRNA sintetase uit verskillende bronne, asook ander sintetases, te ondersoek, is die ammoniumsulfaatfraksioneringstegniek gebruik soos beskryf in hoofstuk 3, met die verskil dat die pH van die S100, so gou dit verkry is, na 7 verhoog is.

4.2.2 Ensiemaktiwiteitsbepalings

Fenielalaniel-tRNA sintetase aktiwiteit is kwalitatief d.m.v. die asilering van tRNA en hidroksamaatvorming bepaal soos beskryf in hoofstuk 2. Die totale aktiwiteite in elke fraksie is egter as presentasies van die totale aktiwiteite soos hulle in die S100 voorgekom het, uitgedruk.

Die ander sintetase-aktiwiteite is op dieselfde wyse as fenielalaniel-tRNA sintetase aktiwiteit bepaal (dieselfde ensiembepalingsmengsels is gebruik). Die hoeveelheid radioaktiewe aminosure wat per inkubasie (0,1 ml.) gebruik is, was: 0,5 μCi (asilering van

tRNA) en 2,5 μCi (hidroksamaatvorming) ^{14}C-L-Glisien (114 mCi/mMol). 5 μCi (asilering van tRNA en hidroksamaatvorming) L-Metionien-metiel-^{3}H (3 300 mCi/mMol). 0,5 μCi ^{14}C-L-Leusien (342 mCi/mMol) vir asilering van tRNA en 2,5 μCi L-Leusien-4,5-^{3}H (58 Ci/mMol) vir die hidroksamaatvorming.

4.2.3 Sukrose digtheidsgradiëntsentrifugering

Rotlewer se oplosbare proteïene is geanaliseer soos beskryf in 3.2.2

4.3 Resultate en Bespreking

In fig. 4.1 op bladsy 32 is die differensiële ammoniumsulfaat fraksionering van fenielalanien (a), glisien (b), metionien (c) en leusien (d) tRNA ligases van rothartselle vergelyk. Dit is duidelik dat die tweevormverskynsel (E_A en E_T) soos dit in die ammoniumsulfaatfraksionering van rothartselle tot uiting kom, uniek t.o.v. fenielalanienaktivering is. Die ander ensieme se aktiwiteite t.o.v. asilering van tRNA en hidroksamaatvorming het gepresipiteer by dieselfde persentasie ammoniumsulfaatversadiging. Hierdie resultate sluit natuurlik nie die moontlikheid van pluralisme by hierdie ensieme uit nie.

Die volgende aspek i.v.m. die universaliteit van die E_A, E_T-vorme van fenielalanien-aktiveringsensiem, was om hierdie verskynsel in ander organe van die rot na te gaan. In fig. 4.2 op bladsy 33 is die differensiële ammoniumsulfaatfraksionering van fenielalaniel-tRNA sintetase in die S100 fraksies van die hart (a) met dié van skeletspier (b), brein (c) en lewer (d) van rotte vergelyk. Uit hierdie resultate is dit duidelik dat die tweevormverskynsel nie net tot die hartselle van rotte beperk is nie, maar ook in ander organe teenwoordig is.

Vorms E_A en E_T van die rotlewer oplosbare fraksie het ook net soos in die rothartpreparaat (sien fig. 3.1; bl 25), in 'n liniêre sukrosedigtheidsgradiënt in twee aktiwiteitspieke geresoleer (fig. 4.3; bl. 34).

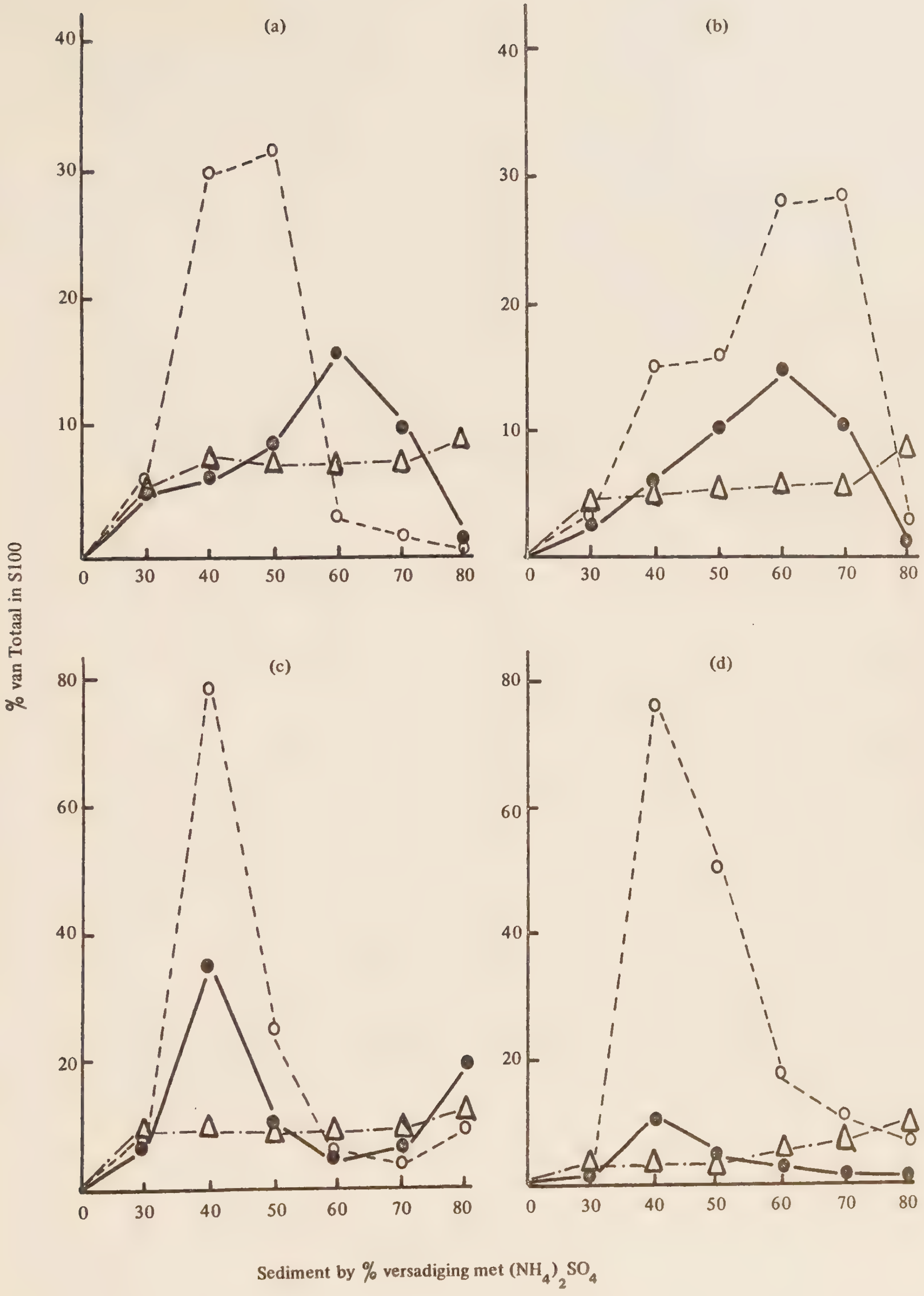


Fig. 4.1 Differensiële Ammoniumsulfaatfraksionering van (a) Phe-tRNA sintetase, (b) Gly-tRNA sintetase, (c) Met-tRNA sintetase en (d) Leu-tRNA sintetase in dieselfde S100-fraksie (proteïenkonsentrasie, 14 mg/ml) soos beskryf in 4.2.1 en 4.2.2.
● —— ● asilering van tRNA
O - - - O aminosuurhidroksamaatvorming
Δ-·-Δ proteïen

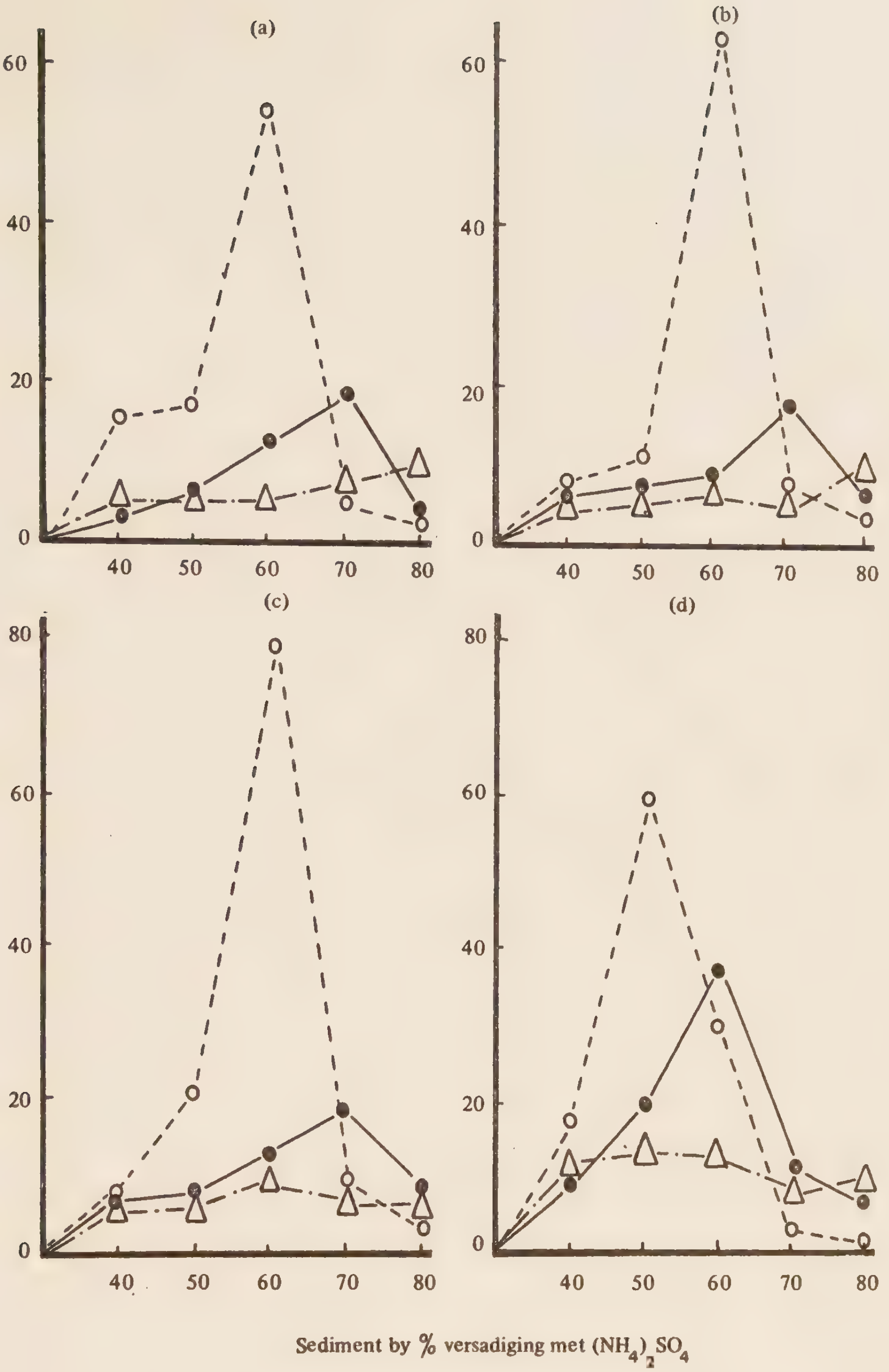


Fig. 4.2 *Differensiële ammoniumsulfaatfraksionering van phe-aktiveringsensiem uit S100-bereidings van (a) hart, (b) skeletspier, (c) brein en (d) lewer soos beskryf in 4.2.1 en 4.2.2. S100 proteïen-konsentrasies was (a) 18.2 mg/ml, (b) 18,0 mg/ml (c) 18,0 mg/ml en (d) 23.2 mg/ml.*

● —— ● *asilering van tRNA met ^{14}C-phe*

O - - - O *^{14}C-phe-hidroksamaatvorming*

Δ-·-Δ *proteïen*

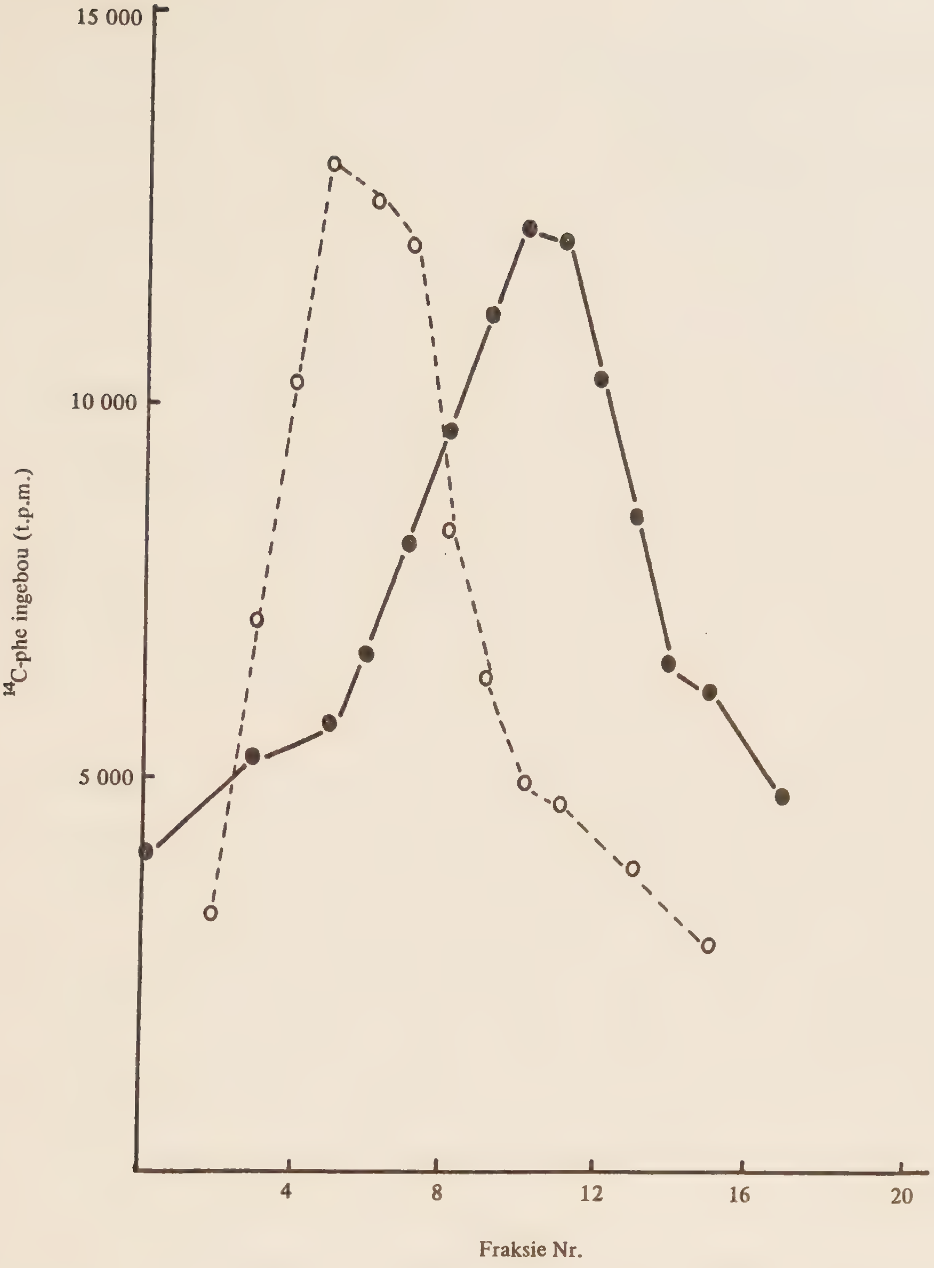


Fig. 4.3 Differensiële sedimentasie van phe-aktiveringsensiem van rotlewer-S100 in 'n liniêre sukrose digtheidsgradiënt (sien 4.2.3)
● —— ● asilering van tRNA met ^{14}C-phe
O - - - O vorming van ^{14}C-phe-hidroksamaat

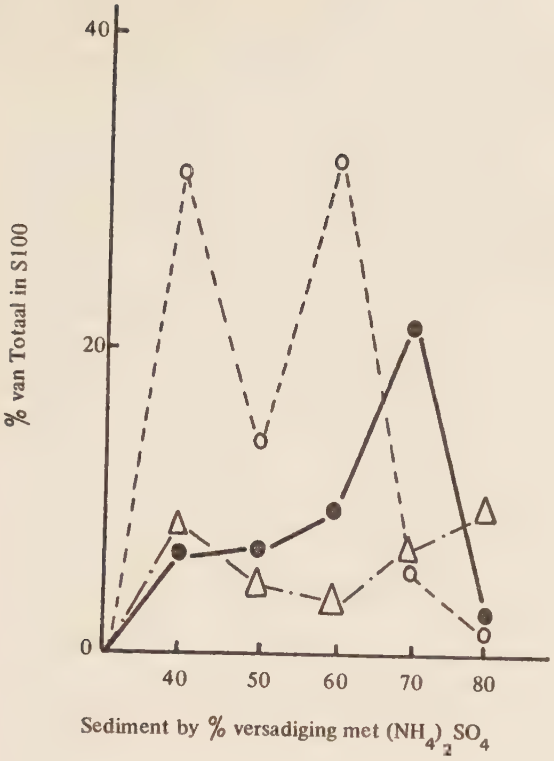


Fig. 4.4 *Differensiële ammoniumsulfaatfraksionering van phe-aktiveringsensiem uit S100 (16,5 mg/ml) van hamsterharte op dieselfde wyse as rotharte (4.2.1 en 4.2.2)*
● —— ● asilering van tRNA met ^{14}C-phe
O - - - O vorming van ^{14}C-phe-hidroksamaat
Δ- · -Δ proteïen

Die voorkoms van fenielalanien-aktiveringsensieme in hamsterhartselle is vervolgens ondersoek. Die differensiële ammoniumsulfaatfraksioneringspatroon van die S100 fraksie van hamsterharte word in fig. 4.4 weergegee. Eerstens kan gesien word dat, soortgelyk aan die rothart, die aktiwiteit van E_A en E_T by verskillende persentasies van versadiging van die sout gepresipiteer het. Tweedens het daar egter 'n nuwe verskynsel na vore gekom, nl. dat E_A aktiwiteit in twee definitiewe pieke tot uiting gekom het – die een aktiwiteit het tussen 0 en 40% $(NH_4)_2SO_4$ versadiging en die ander tussen 50 en 60% versadiging gepresipiteer. Hierdie resultaat is in vier onafhanklike eksperimente aangetoon. Die verskynsel is egter tot dusver nog nie verder ondersoek nie.

Na aanleiding van die eksperimente waaroor in hierdie hoofstuk verslag gedoen is, kan die volgende afleidings gemaak word: Die verskynsel van twee verskillende molekulêre vorms van fenielalanien-aktiveringsensieme soos dit in 'n ammoniumsulfaatfraksionering van rothart oplosbare proteïene na vore kom, is universieel t.o.v. ander organe in die rot, maar uniek in vergelyking met ander aminosuur-aktiveringsensieme wat getoets is. Na aanleiding van die resultate verkry met hamsterharte is die moontlikheid baie sterk dat spesies van mekaar sal verskil met betrekking tot hierdie verskynsel. Die hamster en die rot, wat albei soogdiere is, is fisiologies en veral biochemies baie na aanmekaar, en dit is dus insiggewend dat hulle verskille in hul fenielalanien-aktivering toon. Wat die uitwerking van hierdie verskil op die fisiologie van die diere is, sal egter eers verstaan kan word, indien E_A en E_T beter gekarakteriseer is.

HOOFSTUK 5

ALGEMENE BESPREKINGS

In hierdie skripsie is aspekte van aminosuur-aktivering in hartselle ondersoek. In die eerste instansie is die verspreiding van fenielalaniel-tRNA sintetase in hartselle nagegaan om hierdie ensiem sodoende te lokaliseer. Die meeste aktiwiteit is in die oplosbare fraksie gevind, alhoewel dit nie kompartementasie van die sitoplasma uitsluit nie, aangesien sodanige kompartementasie noodwendig deur die relatief kras homogeniseermetodes, waarmee spierweefsel gehomogeniseer word, vernietig sal word.

Interessante waarnemings is egter gedoen i.v.m. die aktivering van fenielalanien. Twee verskillende molekulêre vorms van fenielalanien-aktiveringsensiem kon aangetoon word. Die moontlike regulerende rol wat hierdie vorms kan speel, sal bespreek word, want indien fenielalanien-aktivering d.m.v. die aktiwiteit van die twee vorms van die ensiem beheer kan word, sal proteïenbiosintese tot 'n hoë mate hierdeur bepaal word.

Die regulering van ensiemaktiwiteit is baie goed saamgevat in 'n oorsigartikel van Newsholme (1965). Die eienskappe van ensieme wat tempobepalende stappe in die intermediêre metabolisme kataliseer, is baie goed in die laat vyftigerjare en vroeë sestigerjare bestudeer, en teorieë vir die regulering van metaboliese paaie berus hoofsaaklik op die eienskappe van hierdie ensieme. Baie van hierdie ensieme besit ten minste twee ruimtelik verskillende punte op die proteïenmolekule, nl. die regulerings- en aktiewe punt, sodanig dat die aktiwiteit van eersgenoemde dié van die aktiewe punt bepaal. Regulering van ensiemaktiwiteit kan egter ook te weeg gebring word deur molekulêre interveranderings tussen meer aktiewe en minder aktiewe vorms van 'n ensiem, hetsy omkeerbaar of onomkeerbaar. 'n Ander manier om die totale intrasellulêre aktiwiteit van 'n ensiem te reguleer, is d.m.v. sy intrasellulêre konsentrasie, hetsy deur die sintese- of degradasietempo.

Indien die twee vorms van fenielalanien-aktiveringsensiem in bg. lig beskou word, kan 'n moontlike molekulêre interverandering tussen die twee vorms as 'n moontlike regulering van proteïenbiosintese gesien word. Daar is baie voorbeelde waar ensieme in aktiewe en onaktiewe vorms bestaan, waarvan die een na die ander vorm kan oorgaan om sodoende biologiese prosesse te reguleer. Die proteolitiese ensieme van die spysverteringskanaal is welbekende voorbeelde van hierdie verskynsel. Hulle word as onaktiewe proteïene („zymogens") gesintetiseer en gesekreteer en word in aktiewe vorms in die lumen van die kanaal deur gedeeltelike hidrolise verander. Die moontlikheid dat die aktiwiteit van aminosuur-aktiveringsensieme d.m.v. soortgelyke meganismes gereguleer word, kom sterk

na vore indien die resultate van Rouget en Chapeville (1970, 1971(a), 1971(b), 1971(c)) met leusiel-tRNA sintetase van *E. coli,* van Lapointe, *et al.* (1972) met glutaniel-tRNA sintetase van dieselfde organisme en van Davies en Marshall (1972) met asparaginiel-tRNA sintetase van konynlewer beskou word. Hierdie drie gevalle verskil egter aansienlik van mekaar en ook van die geval wat in hierdie skripsie beskryf is. Wat al vier gevalle egter in gemeen het, is dat hulle almal die moontlikheid tot regulering, soos hier bespreek, openbaar.

Die subeenheidstruktuur van fenielalaniel-tRNA sintetase van *E. coli* is ondersoek deur Kosakowski en Böck (1970), en uit hul resultate blyk dit dat die proteïen 'n molekulêre massa van 181 000 dalton het, en dat dit uit 4 identiese subeenhede bestaan, elk met 'n molekulêre massa van 43 000 dalton; afsonderlik het hulle geen katalitiese aktiwiteit nie. Indien die molekulêre massas van E_A (194 000 dalton) en E_T (150 000 dalton) met die bg. gegewens vergelyk word, kan oor 'n subeenheid-verskil tussen E_A en E_T gespekuleer word, wat 'n moontlike regulerende interverandering te weeg kan bring aangesien E_A fisiologies onaktief en E_T die „volledige" ensiem is, wat aktief t.o.v. die hele reaksie is.

Om bg. spekulasie te toets is twee uitgangspunte of benaderings nodig. Die eerste is ensimologies en behels die volledige suiwering van beide E_A en E_T om die ensieme beter te karakteriseer, en moontlike interveranderings *in vitro* na te gaan. Die suiwering van E_A en E_T kan moontlik aangehelp word deur die feit dat hierdie ensieme alleenlik by relatief hoë versadigingsgrade van ammoniumsulfaat presipiteer. Ammoniumsulfaatfraksionering berus o.a. op molekulêre massa en dit is selde dat 'n proteïen so groot soos E_A en E_T nie by laer soutkonsentrasies „uitgesout" word nie (sien bv. ander sintetases, hoofstuk 4). In so 'n ammoniumsulfaatfraksie, wat E_A of E_T bevat, behoort daar dan geen (of baie min) proteïene, wat sulke hoë molekulêre massas as E_A of E_T het, te wees. Hiervolgens behoort 'n Sephadex G200 kolom E_A, maar veral E_T, geredelik van die ander ligter proteïene te skei. Benewens die metodes reeds genoem, kan die volgende bekende suiweringsmetodes ook toegepas word (Muench en Berg, 1966): streptomisienpresipitasie van nukleïensure, kolomchromatografie op hidroksiapatiet, karboksiemetielsellulose of diëtielaminoetielsellulose en elektroforese of elektrofokusering. Aminosuur-aktiveringsensieme is baie labiel en veral lang uitgerekte suiweringsmetodes kan hierdeur skipbreuk ly. Beskerming kan gewoonlik gevind word in substrate, reduserende middels soos D.T.T., glutathioon of β-merkaptoethanol. Gliserol kan ook beskerming bied. Die interverandering van vorms tydens suiweringsprosedures moet ook in ag geneem word.

'n Tweede uitgangspunt om hipoteses i.v.m. E_A en E_T te toets is meer fisiologies van

aard en behels die onderwerping van die proefdier aan verskeie toestande en daarna die analise van E_A en E_T. Die rothart kan bv. *in vivo* beïnvloed word deur die toevoeging of weglating van fenielalanien in die rot se dieet, hormoon- of geneesmiddelbehandelings en deur die hart van die rot harder te laat werk deur oefening.

'n Ander aspek wat uit die resultate van hoofstuk 3 spruit, is die moontlike reaksiemeganisme van E_T wat blykbaar sodanig verloop dat geen fenielalanieladenilaat-ensiemkompleks as sulks gevorm word nie; indien soiets wel gevorm word, is dit onreaktief t.o.v. NH_2OH of PPi. 'n Meer akademiese studie sal dus die deeglike meganisme-analise van E_T behels.

Bg. uitgangspunte sal gevolg word in die verdere ontwikkeling van hierdie projek.

MATERIAAL

Proefdiere:

Wyfie albino rotte van ±350 gm is van die universiteit van Kaapstad verkry.

Goue Siriese hamsters van ±200 gm is van „London School of Hygiene" verkry, en is in 'n eie kolonie gehandhaaf d.m.v. broer-suster telings.

Chemikalieë:

Chemikalieë van die hoogste analitiese graad is verkry van E. Merck (Darmstadt, Duitsland), British Drug Houses Ltd. (Poole, Engeland) en C.F. Boehringer und Sohne (G.m.b.h., Mannheim, Duitsland).

Ander chemikalieë en biochemikalieë is verkry van die volgende firmas: EGTA, anorganiese pirofosfatase-gis (Sigma); ATP, PEP, piruvaatkinase, D.T.T., Gis-tRNA, gis-alkoholdehidrogenase, katalase (Miles Serevac); Hidroksielamien-HCl puriss A.R. (Koch-Light Laboratories Ltd.); CM 82-sellulose papier (Whatman Products); Fluoralloy (Beckman instruments); Silica Gel dunlaag chromatogramme (Eastman-Kodak Co., Rochester, U.S.A.).

Alle radioaktiewe materiaal is verkry van „The Radiochemical Centre" (Amersham).

AFKORTINGS

A:	adenosien
AA:	aminosuur
AMP:	adenosienmonofosfaat
ATP:	adenosientrifosfaat
C:	sitosien
°C:	grade Celsius
Ci:	Curie (3.7×10^{10} disintegrasies per sekonde)
CM:	karboksiemetel
cm:	sentimeter
CoA-SH:	Ko-ensiem A
DNA:	deoksiribonukleïensuur
d.p.m.:	disintegrasies per minuut
D.T.T.:	dithiothreitol
E. coli:	*Escherichia coli*
EGTA:	etileenglikol-bis-(β-amino-eter)N,N^1-tetra-asynsuur
g:	versnelling a.g.v. gravitasie, 9.8 meter per sekonde^2
Km:	Michaelis-Menton konstante; is gelyk aan die substraatkonsentrasie wat die helfte van die maksimum ensiemgekataliseerde reaksiesnelheid tot gevolg het.
l:	liter
M:	Molêr
mCi:	millicurie
mg:	milligram
min.:	minuut
ml:	milliliter
mM:	millimolêr
mRNA:	boodskapper ribonukleïensuur
N_2:	stikstof
p:	fosfaatgroep
PEP:	fosfo-enol-piruvaat
phe:	fenielalanien
pH_5-ensiem:	Oplosbare ensiemfraksie wat omkeerbaar by pH_5 denatureer en presipiteer.

pMole:	pikomole
PPi:	anorganiese pirofosfaat
RNA:	ribonukleïensuur
RNase:	ribonuklease
S:	Svedberg-eenheid 1 X 10^{-7} cm/sek
SDS:	Natriumdodecylsulfaat
sek:	sekonde
TCA:	trichloorasynsuur
t.p.m.	telle per minuut
Tris:	tris (hidroksiemetiel) aminometaan
tRNA:	transport ribonukleïensuur
$tRNA^{PHE}$:	transport ribonukleïensuur wat akseptoraktiwiteit vir fenielalanien vertoon.
µCi:	mikrocurie
µg:	mikrogram
µl:	mikroliter
µM:	mikromolêr
v/v:	volume per volume
w/v:	gewig per volume
y:	Gis

VERWYSINGS

Arndt, D.J., Berg, P. (1970). J. Biol. Chem. *245,* 665.

Bandyopadhyay, A.K., Deutscher, M.P. (1971). J. Mol. Biol. *60,* 113.

Barnett, W.E., Brown, D.H., Epler, J.L. (1967). Biochemistry *57,* 1775.

Beers, R.F. Jr., Sizer, I.W. (1952). J. Biol. Chem. *195,* 133.

Beinert, H., Green, D.E., Hele, P., Von Korff, R.W., Ramakrishnan, C.V. (1953). J. Biol. Chem. *203,* 35.

Bennet, T.P., Goldstein, J., Lipmann, F. (1965). Proc. Natl. Acad. Sci. *53,* 385,

Berg, P. (1956). J. Biol. Chem. *222,* 1025.

Berthelot, F., Yaniv, M. (1970). Eur. J. Biochem. *16,* 123.

Borsook, H., Dubnoff, J.W. (1940). J. Biol. Chem. *132,* 307.

Bruton, C.J., Hartley, B.S. (1968). Biochem. J. *108,* 281.

Calender, N., Berg, P. (1966). Biochemistry *5,* 1681.

Caro, L.G., Palade, G.E. (1964). J. Cell. Biol. *20,* 473.

Chou, L., Johnson, T.C. (1970). Biochem. Biophys. Res. Comm. *47,* 824.

Cohen, S.S. (1970). Am. Sci. *58,* 281.

Davies, M.R., Marshall, R.D. (1972). Biochem. Biophys. Res. Comm. *47,* 1386.

Dreizen, P. (1971). An. Rev. of Med. *22,* 363.

Galavazi, G. (1971). Z. Zellforsch. *121,* 531.

Gershman, L.C., Stracher, A., Dreizen, P. (1969). J. Biol. Chem. *244,* 2726.

Hartshorne, D.J., Theiner, M., Mueller, H. (1969). Biochim. Biophys. Acta *175,* 320.

Hecht, L.I., Stephenson, M.L., Zamecnik, P.C. (1959). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. *45,* 505.

Herberg, R.J. (1965). Packard Tech. Bull. Nr. 15.

Herrington, M.D., Hawtrey, H.O. (1970). Bioch. J. *116,* 405.

Heywood, S.M., Rich, A. (1968). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. *59,* 590.

Higashi, S., Ooi, T. (1968). J. Mol. Biol. *68,* 5.

Hirakow, R. (1970). The Am. J. of Cardiol. *25,* 195.

Hirsh, D.I. (1968). Ph.D.-tesis.

Hirsh, D.I., Lipmann, F. (1968). J. Biol. Chem. *243,* 5724.

Hoagland, M.B. (1955). Biochim. Biophys. Acta. *16,* 288.

Hoagland, M.B., Keller, E.B., Zamecnik, P.C. (1965). J. Biol. Chem. *218,* 345.

Huxley, H.E. (1963). J. Mol. Biol. *7,* 281.

Igarashi, K., Matsuzaki, K., Jakeda, Y. (1971). Biochim. Biophys. Acta. *254,* 91.

Igarashi, K., Matsuzaki, K., Jakeda, Y. (1972). Biochim. Biophys. Acta. *262,* 476.

Katz, A.M. (1970). Physiol. Rev. *50,* 63.

Kosakowski, M.H.J.I., Böck, A. (1970). Eur. J. Biochem, *12,* 67.

Lapointe, J., Seno, T., Söll, D. (1972). Federation Proceedings *31,* 449 Abs.

Larson, P.F., Hudgson, P., Walton, J.N. (1969). Nature *222.*

Lee, M., Muench, K.H. (1969). J. Biol. Chem. *244,* 223.

Lemoine, F., Waller, J.P., Van Rapenbusch, R. (1968). Eur. J. Biochem. *4,* 213.

Legato, M. (1971). J. of Molec. and Cell. Cardiol. *1,* 425.

Lipmann, F. (1941). Adv. Enzymology *1,* 99.

Loftfield, R.B. (1972). Progr. Nucleic Acid Research and Molec. Biol. XII, 87.

Loftfield, R.B., Eigner, E.A. (1963). Biochim. Biophys. Acta *72,* 372.

Loftfield, R.B., Eigner, E.A. (1968). Biochemistry *7,* 1100.

Lowley, S. (1965). J. Biol. Chem. *240,* 2421.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.C., Randall, R.J. (1951). J. Biol. Chem. *193,* 265.

Lucas-Lenard, J., Lipmann, F. (1971). Ann. Rev. of Biochemistry *40,* 409.

Mans, R.J., Novelli, G.D. (1961). Arch. Biochem. Biophys *94,* 48.

Marshall, R.D., Zamecnik, P.C. (1970). Biochim. Biophys. Acta *198,* 376.

Martin, R.G., Ames, B.N. (1961). J. Biol. Chem. *236,* 1372.

Maruyama, K. (1964). Arch. Biochem. Biophys. *105,* 142.

McElroy, W.D., De Luga, M., Travis, J. (1967). Science 157, 150.

Mehler, A.H., Chakraburtty, K. (1971). Adv. in Enzymology *35,* 443.

Meister, A. (1965). Biochemistry of the Amino Acids (2 Vol), Tweede uitgawe, Ac. Press N.Y. Vol I – p. 442, Vol. II – p. 907.

Muench, K.H., Berg, P. (1966). Procedures Nucleic Acid Res. Cantoni, G.L. en Davies, D.R., Ed., New York, N.Y. Harper & Row, p. 375.

Munro, H.N. (1968). Fed. Proceedings *27*, 1231.

Newsholme, A.E. (1965). Sci. Progr. *53*, 237.

Pastuszyn, A., Loftfield, R.B. (1972). Biochem. Biophys. Res. Comm. *47*, 775.

Perry, S.V. (1972), Les Surcharges Cardiaques. Ed. Hatt, P.J., L'institut National de la Sante et de la Recherche Medicale, 231.

Peterson, P.J. (1967). Biol. Rev. *42*, 552.

Preiss, J., Berg, P., Ofengaud, E.J., Bergmann, F.H., Dieckmann, M. (1959). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. *45*, 319.

Rouget, P., Chapeville, F. (1970). Eur. J. Biochem. *14*, 489.

Rouget, P., Chapeville, F. (1971(a)) Eur. J. Biochem. *23*, 443.

Rouget, P., Chapeville, F. (1971(b)) Eur. J. Biochem. *23*, 452.

Rouget, P., Chapeville, F. (1971(c)) Eur. J. Biochem. *23*, 459.

Rubin, I.B., Kelmers, A.D., Goldstein, G. (1967). Anal. Biochem. *20*, 533.

Sarin, P.S., Zamecnik, P.C. (1964). Biochim. Biophys. Acta *91*, 653.

Sasaki, R., Watanabe, Y., Morishita, T., Yamagata, S. (1968). Tohoka J. Exptl. Med. *95*, 177.

Schreiber, S.S., Klein, I., Evans, C., Reff, F., Rothschild, M.A., Oratz, M. (1972). Les Surcharges Cardiaques. Ed. Hatt, P.J., L'institut National de la Sante et de la Recherche Medicale. 311.

Straub, F.B. (1942). Stud. Inst. Med. Chem. Univ. Szeged. *2*, 3.

Vallee, B.L., Hoch, F.L. (1955). Proc. Natl. Acad. Sci. *41*, 327.

Vennegoor, C.J.G.M., Bloemendal, H. (1972). Eur. J. Biochem. *26*, 462.

Vennegoor, C.J.G.M., Stols, A.L.H., Bloemendal, H. (1972). J. Mol. Biol. *65*, 375.

Von Ehrenstein, G. (1970). Aspects of Protein Biosynthesis, Ed. Anfinsen, C.B. Jr., Acad. Press, 139.

Woods, E.F., (1969). Biochemistry *8*, 4336.

Yarus, M. (1972(a)). Biochemistry *11*, 2352.

Yarus, M. (1972(b)). Nature New Biol. *239*, 106.

Yarus, M., Berg, P. (1969). J. Mol. Biol. *42*, 171.

Young, M. (1967). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. *58*, 2393.

Geset in 11 op 20 pt Press Roman, Tipografies versorg deur H. Roelofs · Gelitografeer en gebind deur
Nasionale Handelsdrukkery Beperk, Elsiesrivier